

**SANDRO JOSÉ RIBEIRO BONATTO**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE, DURANTE OITO SEMANAS,  
SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO INATO DE PACIENTES,  
PÓS-REMOÇÃO TUMORAL E EFEITO *IN VITRO* DO ÓLEO DE PEIXE  
SOBRE AS CÉLULAS TUMORAIS**

**Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e  
Molecular, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, ênfase em Fisiologia,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes**

**CURITIBA  
2008**

## PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

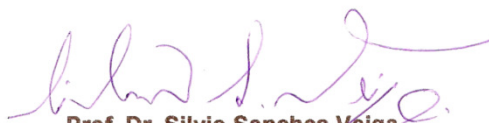
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

---

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Sandro José Ribeiro Bonatto**, no dia 1º de outubro de 2008, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular intitulada: "**Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito in vitro do óleo de peixe sobre as células tumorais**" com a Banca Examinadora constituída pelos professores: : Dr. Roberto Barbosa Bazotte (Universidade Estadual de Maringá - UEM), Dr. João Carlos Domingues Repka (Universidade Integrada do Brasil - UNIBRASIL), Drª. Dorly de Freitas Buchi (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Dr. Ricardo Fernandez Perez (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Dr. Luiz Cláudio Fernandes (orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná - UFPR), e tendo sido Aprovado, recebendo o título de doutor na área de concentração em Fisiologia, desde que apresente a versão definitiva da tese conforme regimento interno do Programa.

Curitiba, 1º de outubro de 2008.



**Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
Biologia Celular e Molecular

“Todo homem deve ser um aprendiz da natureza. Se realmente desejar cumprir o seu dever, deve tratar de conhecer as relações que existem entre a saúde do homem e sua alimentação.”

(Hipócrates 460 a.C – 377 a.C)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes, meu orientador, pela imensa dedicação e amizade.

A todos os pacientes que gentilmente aceitaram participar deste estudo.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Fisiologia.

Ao Prof. Dr. João Repka pela ajuda, amizade e incentivo durante a pesquisa.

Ao Serviço de Oncologia do Hospital Angelina Caron (HAC) pela colaboração.

Aos enfermeiros do departamento de quimioterapia do HAC, Sandra e Luiz pela coleta do sangue;

Aos médicos Luciano Sabóia, Cristiane Sabóia e George Fukushima pela colaboração.

A todos os funcionários do departamento de Oncologia e Patologia do Hospital Angelina Caron.

A todos os professores dos Departamentos de Biologia Celular e Fisiologia.

Aos meus amigos do Laboratório: Andressa, Carina, Carine, Dalton, Dani Pequito, Everson, Fabiola, Gleisson, Isa, Gina, Jaisson, Katia, Loli, Luciana, Marcelo e Ricardo sem vocês seria impossível fazer meu Doutorado!

Aos Departamentos de Bioquímica e Patologia, pelo empréstimo do leitor de microplacas.

Ao Prof. Edvardo B. Ribeiro pela amizade e incentivo (*in memoriam*).

Aos Professores e funcionários do Col. Est. Terra Boa pelo apoio.

As Diretoras Maria do Carmo e Marilis pela compreensão.

A minha família pela compreensão e dedicação.

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>10</b>  |
| 1.1 Ácidos graxos.....   | 11         |
| 1.2 Ácidos graxos poliinsaturados n-3.....                           | 11         |
| 1.3 Sistema imunitário.....  | 16         |
| 1.4 O câncer .....   | 21         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>26</b>  |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>27</b>  |
| <b>4. RESULTADOS SOBRE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS E DE CAQUEXIA.....</b> | <b>42</b>  |
| <b>5. DISCUSSÃO SOBRE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS E DE CAQUEXIA...</b>    | <b>63</b>  |
| <b>6. RESULTADOS REFERENTES AOS PARÂMETROS <i>IN VITRO</i>.....</b>  | <b>78</b>  |
| <b>7. DISCUSSÃO REFERENTE AOS PARÂMETROS <i>IN VITRO</i>.....</b>    | <b>92</b>  |
| <b>8. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                            | <b>97</b>  |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>113</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico

AG: Ácidos graxos

AGPI: Ácidos graxos poliinsaturados

ALX: Receptor para lipoxina

BLTI: Receptor de leucotrieno B<sub>4</sub>'

BMMC: Bromo-metil-metoxi-cumarina

CTGFR: Receptor de crescimento de tecido conectivo

ChemR23: Receptor de quimiocina

COX: Ciclooxygenase

DHA: Ácido docosahexaenóico

EPA: Ácido eicosapentaenóico

FASN: *Síntese de novo* de lipídios

GH: Hormônio do crescimento

HETE: Ácidos hidroxieicosatetraenóico

HPETE: Ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HUVEC: Células endoteliais da veia umbilical humana

IFN- $\gamma$ : Interferon – gama

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LMF: Fator mobilizador de lipídios

LOX: Lipoxigenase

LDH: Lactato desidrogenase

LMF: Fator mobilizador de lipídios

LT: Leucotrieno

LTB4: Leucotrieno da série 4

LX: Lipoxina

MMP: Metaloproteínases de matriz

NAD: Dinucleotídeo adenina nicotinamida

PAF: Fator ativador de plaquetas

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR: Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas

PG: Prostaglandinas

PUFA: Polyunsaturated fatty acid

ROS: Espécies reativas do oxigênio

TGF- $\beta$ : Fator transformante de crescimento – beta

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral – alfa

TX: Tromboxanas

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR: Receptor para fator de crescimento endotelial vascular

## RESUMO

O câncer é caracterizado por muitos passos, envolvendo alterações genéticas, que levam a progressiva transformação nas células normais, tornando-as malignas. Estimativas apontam para mais de 12 milhões de casos no mundo em 2008. Sendo que, aproximadamente, meio milhão será no Brasil. Na etiologia do câncer o ambiente tem papel relevante, sendo que alterações na dieta demonstraram ter grande importância. Vários estudos mostram que uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) do tipo n-3 reduz a incidência de cânceres. O tratamento do câncer pode causar, geralmente, neutropenia. Isto leva a uma redução nas doses das terapias anticâncer e, na maior vulnerabilidade dos pacientes a infecções. Este estudo investigou se a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, é capaz de melhorar a atividade imunitária dos neutrófilos. Pacientes submetidos a tratamento quimioterápico foram divididos em dois grupos: suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe durante oito semanas (T8 S) e os não suplementados (T8). Ambos os grupos tiveram o sangue coletado no primeiro dia de quimioterapia (ZERO) e também após as 8 semanas. Não houve diferença entre o peso corpóreo dos pacientes de ambos os grupos. No grupo T8 S houve: aumento da atividade fagocitária e da produção de ânion superóxido pelos neutrófilos quando comparado a T8; não houve alteração da retenção de vermelho neutro nem da produção de peróxido de hidrogênio em relação ao início da terapia anticâncer, porém quando comparado a T8 esta se elevou. Aumentou a incorporação de EPA e DHA e redução de ácido araquidônico (AA) nos neutrófilos e no plasma dos indivíduos T8 S, em relação ao início da quimioterapia. No plasma de T8 S não ocorreu alteração da concentração de colesterol total, LDL, VLDL e triacilgliceróis em relação ao período zero, porém estas foram mais elevadas nos indivíduos sem suplementação (T8). Ainda, em T8 S houve aumento do colesterol HDL e redução da lactatemia em relação aos demais grupos. *In vitro* foi observado redução da proliferação tumoral nas diluições de 1:5 e 1:10 nas culturas de células tumorais obtidas de mama e cólon;

Palavras chave: câncer, óleo de peixe, AGPI n-3 e neutrófilos.



## ABSTRACT

Cancer is a process characterized by many steps, which includes genetic alterations and gradual transformations in the normal cells, potentially leading them to malignancy. It is estimated that will be more than 12 million new cancer cases around the world in the year of 2008. For Brazil alone a half million cases are expected. The environment plays a key role in the etiology of cancer development, where diet habits are highlighted as main characters. Some studies show that diets rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-3 reduces the incidence of cancers. Cancer treatment can generally cause neutropenia. This study aimed to investigate whether fish oil, rich in PUFA n-3, supplementation to cancer patients' plus tumor withdrawal is able to improve the function of blood neutrophils and the effect of fish oil *in vitro* in different tumor types, as well. Patients in chemotherapy treatment were randomly shared in to groups: intake of 2 g fish oil/day during eight weeks (T8 S) and not supplemented (T8). Blood was withdrawn right before the first chemotherapy session (ZERO) and 8 weeks after the beginning of the chemotherapy treatment. There were no differences in patients' weights at the beginning of the trial. The T8 S group showed an increment of the phagocytic activity and anion superoxide production by neutrophils in relation to T8. No alterations in the neutral red uptake by secretion vesicles, neither in the production of hydrogen peroxide in the T8 S, when compared to the beginning of the anticancer therapy, were observed. However, all these parameters were increased in relation T8. The neutrophils and plasma's concentration of EPA and DHA was increased by supplementation, otherwise the content of the arachidonic acid (AA) was reduced in relation to the beginning of the chemotherapy. There was no alteration in the plasma total cholesterol, LDL, VLDL and triacylglycerols in relation to the beginning of the supplementation; however these values were increased in the individuals without supplementation. In addition, there was an increase in the HDL cholesterol and a reduction in the lactatemia in the T8 S group. *In vitro*, a reduction in the cell proliferation using 1:5 and 1:10 dilutions into breast and colon tumors cells cultures was observed.

Key words: cancer, fish oil, PUFA n-3 and neutrophil.

## 1. INTRODUÇÃO

A palavra lipídeo é derivada do grego *lipos* que significa gordura (CURI *et al.*, 2002). São definidos como moléculas biológicas altamente solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (FAHY *et al.*, 2005). Os lipídios são reconhecidos como moléculas de sinalização desde longa data e possuem a capacidade de provocar profundas respostas fisiológicas (HANNUN & OBEID, 2008). Sendo que as células eucariontes utilizam 5% dos seus genes para a fabricação de lipídios (MEER *et al.*, 2008). Estes desempenham três funções gerais: primeira por serem relativamente pequenos tem função de reserva de energia, principalmente como triacilgliceróis e ésteres esterificados (LANDS, 2007). Segundo formam as membranas celulares, pois possuem a capacidade de ser polares possuindo uma parte hidrofílica e uma hidrofóbica (LEMMON, 2008). Essa propriedade de interagir com o meio aquoso e com outro lipídio foi à base física para a formação espontânea de membranas. Essa propriedade, de anfipatia, foi o princípio químico que propiciou as primeiras células a liberarem produtos internos para o meio externo. E, esse mesmo princípio propiciou a compartimentalização celular. Os lipídios também permitem que algumas proteínas se agreguem a eles e outras se mantenham dispersas (IVANOVA *et al.*, 2007). E, finalmente os lipídios podem atuar como primeiro e segundos mensageiros em vias de transdução de sinal e processos de reconhecimento molecular (WYMAN & SCHNEITER, 2008). Além disso, alguns lipídios recrutam proteínas do citosol e organizam os domínios de membrana formando sítios de recepção ou efetores (MEER *et al.*, 2008). As primeiras moléculas lipídicas responsáveis por reações anafiláticas foram descobertas em 1930, e são os cistenil leucotrienos (HAMMARSTRÖM, 1983). Mais ou menos na mesma época, a ação vasodilatadora das prostaglandinas foi descoberta (WYMAN & SCHNEITER, 2008). Subseqüentemente, o ácido araquidônico foi descoberto como sendo a fonte de formação para os leucotrienos e prostaglandinas (GIL, 2002). A estrutura fundamental dos lipídeos é composta de ácidos graxos ou estruturas diretamente a eles relacionadas, como os alcoóis, aldeídos ou aminas (LEHNINGER *et al.*, 2000). Assim, a compreensão da estrutura química dos

ácidos graxos, bem como de suas características físicas, químicas e biológicas, são fundamentais para o estudo do seu metabolismo e funções (NETTLETON, 1995).

### 1.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos que podem ser representados pela fórmula R-COOH, onde R significa uma cadeia alquil composta de átomos de carbono e hidrogênio, geralmente não ramificados e com número par de átomos de carbono (FAHY *et al.*, 2005). Os átomos de carbono dos AG podem ser identificados por números ou letras a partir do grupo carboxila (numeração  $\Delta$  ou sistema de letras gregas), ou a partir do carbono mais distante da carboxila (sistema de numeração n ou  $\omega$ ) (MONTGOMERY *et al.* 1994; SALA-VILA *et al.*, 2008), da seguinte forma:

|                   |  |            |   |          |         |          |                    |
|-------------------|--|------------|---|----------|---------|----------|--------------------|
| Terminal $\omega$ | CH <sub>3</sub> – CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> – COOH |            |   |          |         |          | terminal carboxila |
| Nº de C           | 6  | 5          | 4 | 3        | 2       | 1        |                    |
| Nº n ou $\omega$  | 1  | 2          | 3 | 4        | 5       | 6        |                    |
| Letras            | $\omega$   | $\omega-1$ |   | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ |                    |

O tamanho da cadeia hidrocarbônica determina a classificação dos AG em: a) cadeia curta: de 2 a 4 átomos de carbono; b) cadeia média: de 6 a 10 átomos de carbono; c) cadeia longa: acima de 12 átomos de carbono (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989; CURI *et al.*, 2002). Porém, o BRITISH NUTRITION FOUNDATION (1999) caracteriza cadeias longas as com 18 carbonos e aquelas com mais de 20 carbonos são chamadas cadeias muito longas. Quanto à presença de insaturações na cadeia hidrocarbônica, temos os saturados, os quais não possuem insaturações na molécula e, os insaturados divididos nos que possuem uma (monoinsaturados) ou mais de uma (poliinsaturados) insaturações na molécula (CURI *et al.*, 2002).

### 1.2 Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI)

Os AG são as unidades fundamentais para a síntese de lipídeos, constituídos por cadeias de átomos de carbono, ligados átomos de hidrogênio. São importantes

fontes de energia para o metabolismo (MENENDEZ & LUPU, 2007). Podem ser provenientes de duas maneiras para o metabolismo animal: a exógena vinda da alimentação e, a endógena vinda da biossíntese, a qual é catalisada por um complexo heterodimérico de 250-270 kDa chamada sintetase ácido graxo (FASN) (VESCOVI *et al.*, 2008). As propriedades dos AG, como solubilidade e flexibilidade, são determinadas pelo tamanho da cadeia e grau de insaturação, sendo que AG poliinsaturados de cadeia longa, são mais flexíveis e solúveis que os saturados (NETTLETON, 1995). Há duas importantes famílias de AG poliinsaturados. A família n-6 (ômega-6 ou  $\omega$ -6), derivada do AG essencial Linoléico que é convertida em ácido araquidônico; e a família n-3 (ômega-3 ou  $\omega$ -3), derivada do AG essencial  $\alpha$ -Linolênico que é convertida em ácido eicosapentaenóico (EPA) e em ácido docosaexaenóico (DHA). Em adição, as duas famílias não são interconvertidas (JIANG *et al.*, 1997; CALDER, 2001; RHEE, 2008). Esses dois ácidos são considerados essenciais (AGE) porque não podem ser sintetizados no organismo, devido à falta das enzimas  $\Delta$ 12 dessaturase e  $\Delta$ 15 dessaturase e, serem imprescindíveis ao organismo (FIGURA 1).

A ausência desses nutrientes na dieta está associada ao aparecimento de síndromes que podem levar à morte. A essencialidade dos AGPI n-6 é conhecida desde a década de 1930. Sua deficiência, por exemplo, esta associada a problemas dérmicos. Quanto ao AGPI n-3, só após 1980, é que se descobriu sua necessidade na dieta, para evitar principalmente distúrbios neurológicos e visuais (CURI *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que a ingestão de peixes, principal fonte de AGPI n-3, reduz o risco de doenças cardiovasculares (HE *et al.*, 2002; WILLETT & SPAMPFER, 2003, SIMOPOULOS, 2006). Segundo LANDS, 2008, há 50 anos, em resposta ao crescente número de doenças cardíacas a Associação Americana do Coração, (AHA - *American Heart Association*) aconselhou a população a seguir quatro passos:

1. Ingerir menos calorias;
2. Ingerir menos calorias como gorduras;
3. Trocar gordura saturada por gordura insaturada;
4. Ingerir gordura poliinsaturada.

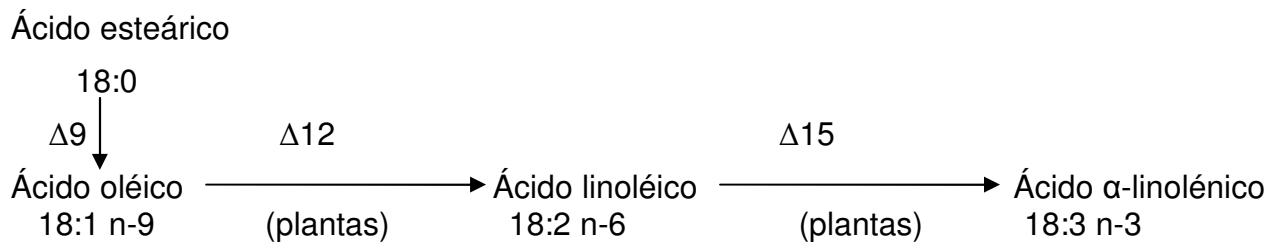


FIGURA 1: Metabolismo de ácidos graxos. Enzimas dessaturases  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ .

No início do século XX foi descrito um AG de 20 carbonos com 4 insaturações, denominado ácido araquidônico (AA). Seu nome é derivado do ácido araquídico, AG saturado, que foi isolado do amendoim (*Arachis hypogaea*). Este gênero de planta possui raízes semelhantes à teia de aranha, provavelmente dando origem ao nome do AA (CURI *et al.*, 2002). Os mamíferos podem formar o AA por processos enzimáticos. Para tal, é necessário que seja ingerido ácido linoléico (n-6), ou ácido  $\gamma$ -linolênico (n-6). O AA (ácido eicosatetraenóico n-6, com 20 átomos de carbono e 4 duplas ligações) é o principal responsável pela formação dos eicosanóides das séries 2 e 4: prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e lipoxinas (FIGURA 2), e, também pode participar diretamente na sinalização celular e expressão gênica (MIYASAKA *et al.*, 1996; MCENTEE & WHELAN, 2002; VOLEK *et al.*, 2008). Eicosanóides são substâncias biologicamente ativas, com meia-vida curta (alguns minutos) que contêm 20 átomos de carbono e atuam localmente desencadeando mudanças nas células ou tecidos onde foram produzidos, sendo sintetizados, preferencialmente, a partir do AA (FIGURA 3) (GIL, 2002; LAPILLONNE *et al.*, 2003).

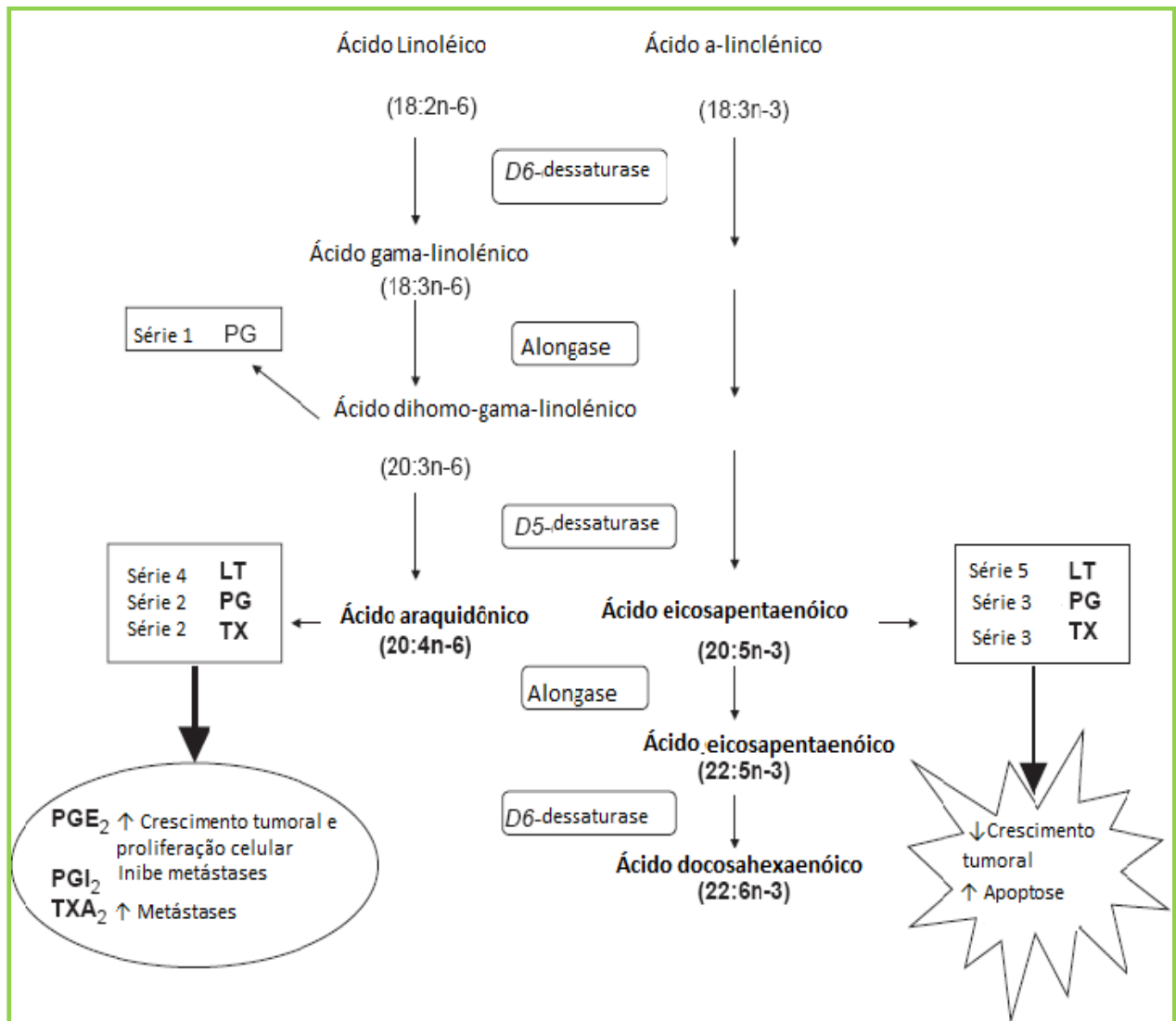


FIGURA 2: Metabolismo dos AGPI n-3 e n-6 e seus supostos efeitos em tumores. Esses AGPI competem pela mesma série de enzimas (dessaturases e alongases). Os AGPI de 20 carbonos podem atuar como precursores de diferentes eicosanóides, incluindo leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e tromboxanas (TX). Adaptado de ROYNETTE *et al.*, 2004.

As prostaglandinas são encontradas em pequenas concentrações em praticamente todos os tecidos dos mamíferos (MANTOVANI, *et al.*, 2008). Elas foram primeiramente isoladas em sêmen de humanos e de animais e inicialmente acreditou-se que elas eram secretadas apenas pela próstata. Elas podem ser sintetizadas a partir do

ácido  $\gamma$ -linolênico, araquidônico e EPA (TAPIERO, *et al.*, 2002). Os leucotrienos foram primeiramente encontrados em leucócitos. Atuam como importantes sinalizadores biológicos tendo papel relevante nas crises asmáticas (HAMMARSTRON, 1983). Tromboxanas são produzidas pelas plaquetas e atuam na coagulação sanguínea (WANG & DUBOIS, 2008). As lipoxinas são eicosanóides com função antiinflamatória, são sintetizadas a partir do AA pela ação da lipoxigenase (MCMAHON & GODSON, 2004; SERHAN *et al.*, 2008). Contudo, o ácido eicosapentaenóico (EPA, n-3) e o ácido dihomog- $\gamma$ -linolênico (n-6) também podem participar da síntese de eicosanóides (BNF, 1999). Substâncias similares são produzidas a partir desses dois AG (n-3 e n-6) e os dois sistemas competem pelas mesmas enzimas. Entretanto, as substâncias derivadas da família n-3 tendem a ter menor efeito imunitário bem como menor potência inflamatória do que àquelas da família n-6 (BERQUIN *et al.*, 2008). Isto tem levado ao interesse em se há um papel para o óleo de peixe, rico em ácido graxo de cadeia longa n-3, no tratamento de condições inflamatórias tais como artrite reumatóide. O EPA é o principal AGPI n-3 e, é sintetizado pelas algas marinhas sendo encontrado na dieta como um componente do óleo de peixe (MIYASAKA *et al.*, 1996, BNF, 1999).

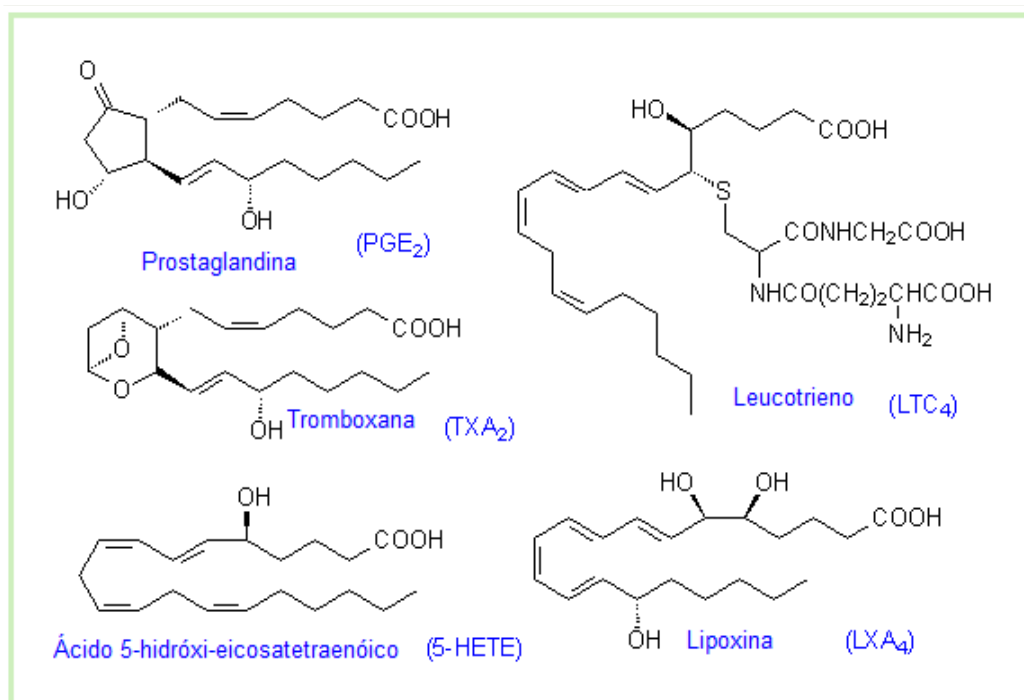


FIGURA 3: Fórmula estrutural dos principais eicosanóides. Adaptado de WYMAN & SCHENEITER, 2008.

Desde a década de 1970, com os trabalhos de DYERBERG *et al.*, 1975, os ácidos graxos poliinsaturados vem despertando interesse, pois estudos mostraram que populações que ingerem dietas ricas em peixes, tem baixa incidência de trombose, doenças cardíacas coronarianas e infarto do miocárdio. Desde então inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que o AGPI n-3 exibe menos propriedades inflamatórias do que quando comparado com os AGPI n-6. Além, de benefícios na prevenção e no desenvolvimento do câncer (ROYNETTE *et al.*, 2004; GORJÃO *et al.*, 2006; TROMBETTA *et al.*, 2007; BENETOU *et al.*, 2008; NAGAO & YANAGITA, 2008 TANAKA *et al.*, 2008). As concentrações de EPA e DHA variam muito entre as populações, como a dos esquimós que habitam a Groenlândia (10-14 g/dia), japoneses e orientais (3 g/dia) e Ocidentais (<0,5 g/dia). Além da função energética, que é básica a todo lipídio, os AGPI da família n-3 exercem modulação do sistema imunitário, dependendo da dose ingerida podem ser incorporados na membrana celular, aumentando sua fluidez e influenciando mediadores da produção de citocinas e na proliferação celular (KOCH & HELLER, 2005). Os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 trazem estes benefícios ainda não são totalmente conhecidos.

### **1.3 Sistema imunitário**

O papel do sistema imunitário no câncer sempre foi objeto de estudo. Inicialmente acreditava-se que os leucócitos infiltrados representavam uma tentativa para erradicar as células neoplásicas (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Em tumores gástricos, de cólon e reto, em humanos, infiltração leucocitária, principalmente células NK estão associados a bom prognósticos. Por outro lado, infiltrações de leucócitos de células como macrófagos em carcinoma de mama e de mastócitos em adenocarcinoma de pulmão e melanoma estão associados a mau prognóstico (VISSER *et al.*, 2006). O sistema imunitário nos protege contra agressões de patógenos e pode ser dividido em dois tipos: o inato e o adaptativo (JANEWAY *et al.*, 2000; SANSONETTI, 2004). As células são chamadas geralmente de leucócitos, as quais estão divididas em duas categorias, os fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e



os linfócitos. A comunicação entre os dois sistemas acontece por contato direto entre as células ou pela produção de mensageiros químicos, as citocinas (CALDER, 2001).

O sistema imunitário inato possui enorme plasticidade e capacidade de produzir inúmeras citocinas, quimiocinas, metaloproteases, espécies reativas do oxigênio (ROS), histaminas e outros mediadores bioativos. Cronicamente ativadas estas células são peças chave na modulação da sobrevivência celular (proliferação e morte), assim como nos processos de metabolismo da matriz extracelular. Os mecanismos pelos quais o sistema imunitário inato regula o desenvolvimento do câncer podem ser: diretos tais como indução de danos ao DNA pela geração de radicais livres; regulação parácrina de vias intracelulares (através do fator nuclear  $\kappa B$ ); ou indiretos como a promoção da angiogênese e remodelamento de tecidos pela produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e metaloproteases, pela regulação da ciclooxigenase 2 (COX 2) e pela supressão das respostas imunitárias antitumorais (VISSER et al., 2006).

Os neutrófilos fazem parte do sistema de defesa inato. Quando ocorrem infecções, há rápida migração de neutrófilos para o local. Estes são capazes de combater os agentes invasores por fagocitose, liberação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ROSN) e por liberação de moléculas bactericidas (SANE, *et al.*; 1999; COUSSEN & WERB, 2002; BRUNO, *et al.*, 2004; FRITSCH, *et al.*, 2005). O sistema inato é a primeira linha de defesa e, é especialmente eficiente em defender o organismo contra o ataque de bactérias e fungos. Os neutrófilos possuem papel chave no sistema imunitário inato. Eles são as primeiras células de defesa a chegar ao local de infecção. Estão presentes na circulação sanguínea e, quando ocorre invasão por patógenos são as primeiras células a chegarem ao local, por um processo chamado diapedese. No local da infecção aumentam sua sobrevivência que é normalmente de oito a doze horas. Fazem isso retardando o processo de apoptose o que permite que essas células fagocitem os agentes invasores e, concomitantemente ocorre o aumento de seus progenitores na medula óssea. O número de neutrófilos é constante em indivíduos saudáveis, porém pode haver alterações em situação de estresse, como tratamentos quimioterápicos ou infecções graves (CRIGHTON & PUPPIONE, 2006).

Mediadores exógenos como peptídeos derivados de bactéria e endógenos como os leucotrienos, prostaglandinas e citocinas atuam como recrutadores para

neutrófilos (FIGURA 4). No local da infecção os neutrófilos fagocitam os germes assim como resíduos celulares existentes no local. Os micróbios fagocitados formam os fagossomos onde ocorrerá a fusão de lisossomos, formando os fagolisossomos, onde enzimas degradativas provenientes dos lisossomos atuarão e, também são produzidas espécies reativas do oxigênio. Estes mecanismos garantem a proteção dos indivíduos contra o ataque de patógenos (SERHAN *et al.*, 2008).

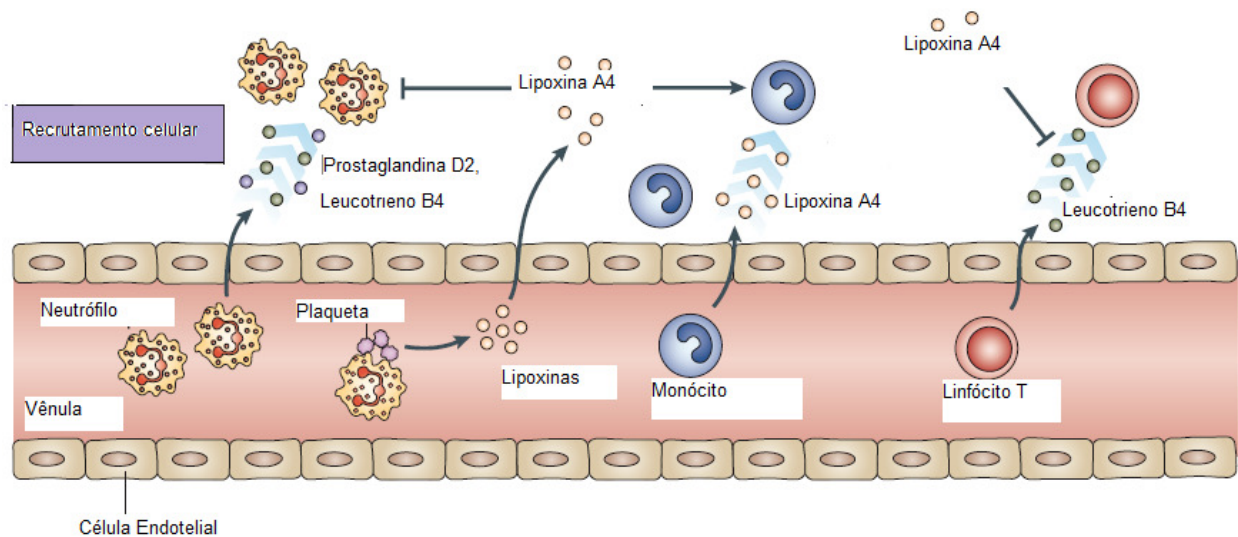


FIGURA 4: Processo inflamatório, adaptado de SERHAN *et al.*, 2008.

Uma vez o processo de defesa tenha se iniciado, os patógenos são eliminados via fagocitose e, a infecção deve ser resolvida de modo a evitar que se torne crônica. O processo de finalização de uma inflamação consiste em remoção ou redução de leucócitos e resíduos derivados de áreas inflamadas para o restabelecimento da homeostase. Este mecanismo de término de inflamação é mediado por moléculas lipídicas conhecidas como resolvinas, lipoxinas e protectinas, as quais são sintetizadas a partir dos AGPI n-3, EPA e DHA (LEVY *et al.*, 2001). Esta família de mediadores lipídicos, endógenos, não é imunossupressiva e sim funciona como finalizadores de inflamação. Pois, enviam potentes sinais para neutrófilos e eosinófilos pararem de se infiltrar; ativam macrófagos para fagocitarem microorganismos e células em apoptose; aumentam a saída de fagócitos da área de inflamação e estimulam a expressão de moléculas envolvidas na defesa antimicrobial. As lipoxinas A4 e B4 inibem a diapedese

de neutrófilos em áreas de inflamação, atuando através do seu receptor (ALX) (FIGURA 5). Este receptor é acoplado à proteína G e, mobiliza  $\text{Ca}^{2+}$  e induz mudanças na fosforilação de proteínas do citoesqueleto, resultando na redução da atividade de neutrófilos (SERHAN *et al.*, 2008).

Outros mediadores endógenos importantes são as citocinas. Este termo foi introduzido por Stanley Cohen em 1974 (MATARESE, 2004). A palavra citocina vem de cito = célula e cinina = hormônio, são proteínas semelhantes a hormônios que permite a comunicação entre a célula e o ambiente externo. O termo citocina é usado para designar várias substâncias como: linfocinas, monocinas, interleucinas, fatores estimulantes de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas (TAYAL & KALRA, 2008). São secretadas por diversos tipos celulares como os leucócitos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras (DUNLOP & CAMPBELL, 2000). Apresentam diversas funções como: mediar e regular respostas imunitárias, inflamação e hematopoiese. As citocinas possuem 3 propriedades: pleiotropia, isto é, elas podem atuar de maneira diferente nos diferentes tipos celulares; redundância, ou seja, funções similares podem ser estimuladas por diferentes citocinas; multifuncionalidade refere-se ao fato de que uma mesma citocina pode regular diferentes funções imunitárias (TAYAL & KALRA, 2008). O sistema imunitário tem papel relevante no desenvolvimento tumoral, pois além de produzir citocinas também atua na imunovigilância. E, apenas quando as células tumorais conseguem sobrepujar as barreiras do sistema imunitário é que ocorre a progressão tumoral e a morte do hospedeiro (ZITVOGEL, *et al.*, 2008).

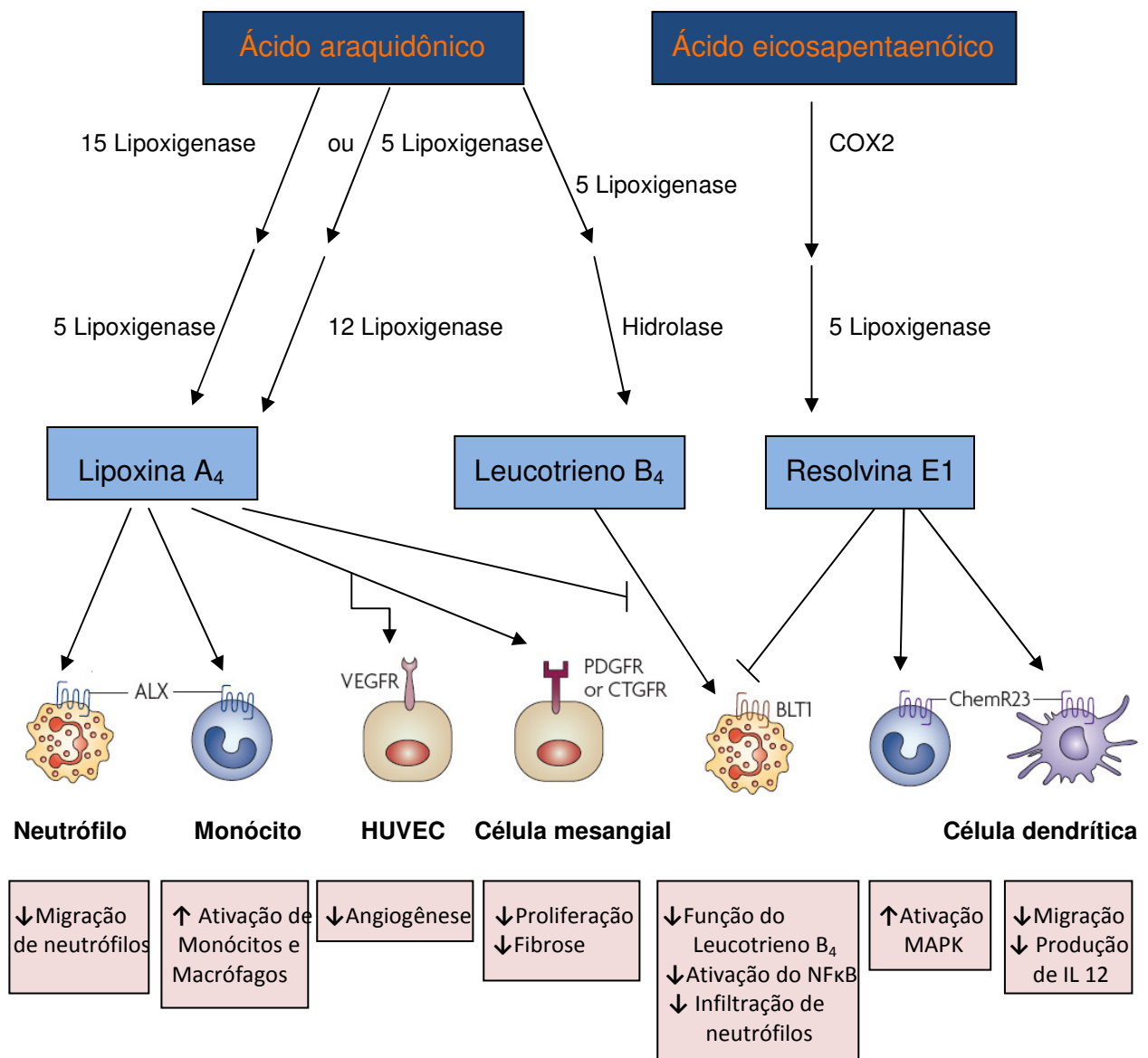


FIGURA 5. Esquema dos papéis da lipoxina e resolvina E1, sendo ALX: receptor para lipoxina A<sub>4</sub>; VEGFR: receptor para fator de crescimento endotelial vascular; HUVEC: células endoteliais da veia umbilical humana; PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas; CTGFR: receptor de crescimento de tecido conectivo; BLT1: receptor de leucotrieno B<sub>4</sub>; ChemR23: receptor de quimiocina. Adaptado de SERHAN *et al.*, 2008.

## 1.4 O câncer

Há consenso que os tumores são linhagens monoclonais de um único progenitor e, que através de inúmeras mutações e seleções tornam-se estruturas multicelulares (KITANO, 2004). Apresenta heterogeneidade celular, como fibroblastos, células epiteliais, células dos sistemas imunitário, inato e adaptativo, células mesenquimatosas, assim como células que formam vasos sanguíneos e linfáticos (CHE *et al.*, 2006; KELLY, 2008). Sendo que a homeostase, neste microambiente, é mantida pela colaboração e interação entre estes diversos tipos celulares (VISSER *et al.*, 2006; VERMEULEN, *et al.*, 2008). A tumorigênese nos seres humanos é um processo caracterizado por muitas etapas, que envolvem alterações genéticas, com progressivas transformações nas células normais, tornando-as malignas (MORENO, 2008). O oncogenoma constitui-se de inúmeras alterações nos cromossomos, cromatina e nucleotídeos. Estas alterações incluem aberrações irreversíveis no DNA, em especial nos genes ou cromossomos. Elas também incluem mudanças potencialmente reversíveis, conhecidas como modificações epigenéticas do DNA e/ou das proteínas histonas, que estão associadas com o DNA na cromatina. Estas alterações reversíveis e irreversíveis podem alterar milhares de genes e/ou vias de transcrição regulatória. Esses eventos resultam na ativação ou inibição e vários eventos biológicos, causando os vários aspectos patofisiológicos, incluindo angiogênese, metástase, evasão do sistema imunovigilância e alterações no crescimento celular e metabolismo (HANAHAN & WEINBERG, 2000; LOWE, *et al.*, 2004; ZITVOGEL *et al.*, 2006; CHIN & GRAY, 2008). Uma alteração metabólica bastante comum é o aumento da lipogênese, proveniente do aumento da glicólise, esse efeito é conhecido como efeito de Warburg (PESKIN & CARTER, 2008).

As neoplasias podem ser classificadas em malignas e benignas. Os tumores malignos, cânceres, são caracterizados por suas células serem ávidas consumidoras de glicose e liberarem ácido láctico; terem alto gasto de energia devido ao aumento da síntese protéica e de DNA; terem capacidade de invadir tecidos e órgãos, metástase; serem capazes de aumentarem a *síntese de novo* de ácidos graxos. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se

multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (OKADA & MAK, 2004; VERMEULEN *et al.*, 2008). Quanto à origem do tecido, os tumores podem ser divididos em carcinomas, que são tumores sólidos derivados do tecido epitelial e representam a maioria dos tumores malignos no mundo, sendo que na União Européia respondem por aproximadamente 2 milhões de diagnósticos por ano (PANTEL, *et al.*, 2008); sarcomas que são cânceres provenientes dos tecidos conjuntivos e musculares. Os cânceres de sistema nervoso e as leucemias não se enquadram neste tipo de divisão (FERREIRA E ROCHA, 2004).

Nas neoplasias malignas, a multiplicação celular faz a massa tumoral crescer e a partir de certo tamanho a quantidade de oxigênio que chega por difusão não é mais suficiente para atender as necessidades do tumor, assim ocorre à necessidade da formação de novos vasos sanguíneos, processo este chamado de angiogênese (WEIDEMANN & JOHNSON, 2008). Em seguida, ocorrem os processos de metástases, onde células tumorais vão colonizar outras áreas do corpo. As células devem completar uma série de etapas, antes de a neoplasia ser clinicamente identificada. Primeiramente, as células devem se separar do tumor principal, invadir os tecidos vizinhos e a membrana basal, entrar e sobreviver na circulação sanguínea, linfática ou no espaço peritoneal e migrar até o órgão alvo (HUNTER, 2004).

Estimativas da *American Cancer Society* ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)) apontam que o numero de casos de câncer vem subindo e para 2008 são estimados mais de 12 milhões de novos casos no planeta. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA – <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>), as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (TABELA 1). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do país; o que fica bem evidenciado ao observar-se a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de uma maneira geral, apresentam as maiores

taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (TABELA 2).

TABELA 1: Estimativa dos casos de câncer, por região do Brasil, de 2008/2009 pelo Instituto Nacional do Câncer

| Região        | Estimativa dos Casos Novos |                |                |
|---------------|----------------------------|----------------|----------------|
|               | Masculino                  | Feminino       | Total          |
| Norte         | 8.470                      | 9.150          | 17.620         |
| Nordeste      | 36.600                     | 42.360         | 78.960         |
| Centro-Oeste  | 14.460                     | 14.050         | 28.510         |
| Sul           | 52.000                     | 47.580         | 99.580         |
| Sudeste       | 120.330                    | 121.730        | 242.060        |
| <b>BRASIL</b> | <b>231.860</b>             | <b>234.870</b> | <b>466.730</b> |

FONTE: INCA (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>)

TABELA 2: Estimativa dos casos de câncer, por localização corpórea, de 2008/2009 pelo Instituto Nacional do Câncer.

| Localização Primária        | Norte | Nordeste | Centro-Oeste | Sul   | Sudeste |
|-----------------------------|-------|----------|--------------|-------|---------|
| Mama Feminina               | 1.210 | 7.630    | 2.630        | 9.500 | 28.430  |
| Traquéia, Brônquio e Pulmão | 1.020 | 3.630    | 1.690        | 7.210 | 13.720  |
| Estômago                    | 1.200 | 3.840    | 1.250        | 4.360 | 11.150  |
| Próstata                    | 1.750 | 9.820    | 3.200        | 9.500 | 25.260  |
| Colo do Útero               | 1.700 | 4.720    | 1.350        | 3.470 | 7.440   |
| Cólon e Reto                | 550   | 2.680    | 1.430        | 5.950 | 16.380  |
| Esôfago                     | 230   | 1.360    | 560          | 3.110 | 5.290   |
| Leucemias                   | 530   | 1.900    | 650          | 1.820 | 4.640   |
| Cavidade Oral               | 400   | 2.500    | 750          | 2.500 | 8.010   |

|                     |               |               |               |               |                |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Pele Melanoma       | 150           | 450           | 250           | 1.950         | 3.120          |
| Outras Localizações | 4.550         | 14.190        | 7.260         | 27.270        | 64.610         |
| <b>Subtotal</b>     | <b>13.290</b> | <b>52.720</b> | <b>21.020</b> | <b>76.640</b> | <b>188.050</b> |
| Pele não Melanoma   | 4.330         | 26.240        | 7.490         | 22.940        | 54.010         |
| <b>TOTAL</b>        | <b>17.620</b> | <b>78.960</b> | <b>28.510</b> | <b>99.580</b> | <b>242.060</b> |

FONTE: INCA (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>)

Um sintoma muito comum em indivíduos com câncer é a caquexia, a qual é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer em estágio avançado. A síndrome da caquexia aparece como resultado de varias mudanças metabólicas caracterizadas pelo hipercatabolismo, resposta de proteínas de fase aguda, falência do anabolismo devido em parte à ingestão inadequada de alimentos (FEARON, *et al.*, 2006). O metabolismo de lipídeos encontra-se alterado, resultando em depleção das reservas de gordura e concentrações elevadas de lipídeos circulantes, glicerol e AG livres, produzidos pela hidrólise de triacilgliceróis. Esta hiperlipidemia ocorre pela diminuição da lipase protéica (TISDALE, 2001). Alguns estudos sugerem que o tumor produz substancias lipolíticas capazes de induzirem a lipólise e aumentarem a oxidação de AG (GUIMARÃES *et al.*, 2002). Experimento em modelos animais e em humanos com caquexia provocada pelo câncer foi identificado uma substância denominada fator mobilizador de lipídios (LMF – *Lipid-mobilizing factor*). Este fator atuaria diretamente nos adipócitos para estimular a lipólise de maneira semelhante à dos hormônios lipolíticos (GH, catecolaminas). Este efeito lipolítico é diferente do produzido por citocinas, pois estas aumentam a lipólise pela inibição da lipase protéica (DUNLOP & CAMPBELL, 2000; KELLY, 2008). Os mediadores desse processo são produzidos pelo próprio tumor e pelo corpo em resposta ao tumor. A estes mediadores se incluem, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), hormônios neuroendócrinos e fatores indutores de proteólise (TISDALE, 2004).

Estudos clínicos com 18 pacientes com caquexia de câncer de pâncreas, onde não se podia fazer a ressecção, mostraram diminuição da perda de peso quando receberam suplementação com de óleo de peixe (dose de 2,2 g de EPA e 1,4 g de DHA), diariamente. Estes pacientes perdiam em média 2,9 kg/mês e, após 3 meses de



suplementação, a maioria dos pacientes teve seus pesos estabilizados e, ganharam, em torno de 0,3 kg/mês. Não houve mudanças na porcentagem total de fluidos no corpo dos pacientes, durante o estudo, sugerindo que o ganho de peso foi de massa magra e não da retenção de fluidos (BARBER, 2001).

Dados prévios do nosso laboratório (BONATTO *et al.*, 2004; PINTO JR *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005; MUND *et al.*, 2007) demonstraram que o óleo de peixe, rico em AGPI n-3, é capaz de reduzir o crescimento tumoral e o grau de caquexia em ratos portadores de tumores de Walker 256. Estudos em humanos (BARBER, 2001; BAUER & CAPRA, 2005; READ *et al.*, 2007; SAUER *et al.*, 2007) mostraram que ocorre melhoria na qualidade de vida de pacientes portadores de câncer. Há um grande número de efeitos biológicos que, tem sido aventado, contribuir para a supressão do câncer pelos AGPI n-3. Estes efeitos incluem alterações nas propriedades das células tumorais como proliferação, invasão, metástase, apoptose e ativação das células de defesa do organismo. Os mecanismos moleculares para que ocorram estes eventos celulares ainda não estão bem definidos (BERQUIN *et al.*, 2008). Assim, neste estudo investigamos a ação dos AGPI n-3 sobre sistema imunitário inato de pacientes submetidos à quimioterapia e a ação *in vitro* do óleo de peixe em células tumorais.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho objetivamos estudar o efeito da suplementação com óleo de peixe durante oito semanas sobre a funcionalidade de neutrófilos *in vivo* e, a ação do óleo de peixe em diferentes tumores humanos *in vitro*. Para alcançarmos estes objetivos foram analisados:

- Dados biométricos dos pacientes com câncer;
- A atividade fagocitária dos neutrófilos;
- O englobamento de vermelho neutro pelas vesículas de secreção dos neutrófilos;
- A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos;
- A produção de ânion superóxido pelos neutrófilos;
- Incorporação de ácidos graxos em neutrófilos;
- Análises bioquímicas do plasma;
- Incorporação de ácidos graxos no plasma;
- A proliferação das células tumorais, cultivadas na presença de óleo de peixe, pela incorporação de [2-<sup>14</sup>C]-timidina em DNA;
- Apoptose e necrose das células tumorais por citometria de fluxo;
- Lipoperoxidação dos tumores.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos deste trabalho, envolvendo seres humanos, foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Angelina Caron (HAC) parecer 004/04 (ANEXO 1) (Campina Grande do Sul, PR, BR) e, referendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do setor de Ciências Biológicas da UFPR (ANEXO 2). Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram termo de livre consentimento e esclarecimento. Este estudo teve a participação de 38 pacientes, submetidos a tratamento quimioterápico (TABELAS 3 e 4) e, 40 pacientes que sofreram cirurgias de ressecção tumoral, todos atendidas pelo Serviço de Oncologia do HAC. Os pacientes que foram suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe (Herbarium ®) receberam instrução para ingerirem as cápsulas uma após o almoço e a outra após o jantar. Estes pacientes foram selecionados de maneira aleatória tendo como critério de exclusão outras patologias concomitantes.

TABELA 3: Tipos tumorais e drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento dos pacientes não suplementados.

| Paciente | Tipo tumoral              | Quimioterápico                |
|----------|---------------------------|-------------------------------|
| 01       | Adenocarcinoma de reto    | Fluorouracil e leucovorin     |
| 02       | Adenocarcinoma de reto    | Fluorouracil e leucovorin     |
| 03       | Adenocarcinoma de cólon   | Fluorouracil e leucovorin     |
| 04       | Adenocarcinoma de cólon   | Fluorouracil e leucovorin     |
| 05       | Adenocarcinoma de reto    | Fluorouracil e leucovorin     |
| 06       | Adenocarcinoma de cólon   | Fluorouracil e leucovorin     |
| 07       | Adenocarcinoma de reto    | Fluorouracil e leucovorin     |
| 08       | Adenocarcinoma de reto    | Fluorouracil e leucovorin     |
| 09       | Neoplasia maligna de reto | Fluorouracil e leucovorin     |
| 10       | Adenocarcinoma de cólon   | Fluorouracil e leucovorin     |
| 11       | Adenocarcinoma de cólon   | Fluorouracil e leucovorin     |
| 12       | Carcinoma de faringe      | Fluorouracil e leucovorin     |
| 13       | Carcinoma de mama         | Ciclofosfamida, metotrexato e |

|    |                                       |   |
|----|---------------------------------------|---|
|    |                                       | fluorouracil  |
| 14 | Carcinoma de esôfago                  | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 15 | Linfoma não Hodgkin                   | Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona |
| 16 | Carcinoma de hipofaringe              | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 17 | Carcinoma epidermóide de colo uterino | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 18 | Sem especificação                     | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 19 | Carcinoma gástrico                    | Fluorouracil e leucovorin                               |

TABELA 4: Tipos tumorais e drogas quimioterápicas utilizadas nos tratamentos dos pacientes suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe, ao final de 8 semanas.

| Paciente | Tipo tumoral                              | Quimioterápico  |
|----------|---|---|
| 01       | Linfoma não Hodgkin                       | Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona |
| 02       | Neoplasia maligna de reto                 | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 03       | Carcinoma escamomedular de laringe        | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 04       | Adenocarcinoma de esôfago                 | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 05       | Adenocarcinoma gástrico                   | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 06       | Carcinoma de hipofaringe                  | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 07       | Carcinoma de mama                         | Ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil              |
| 08       | Carcinoma de células gigantes do útero    | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 09       | Adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 10       | Adenocarcinoma de ovário                  | Fluorouracil e cisplatina                               |
| 11       | Adenocarcinoma de cólon                   | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 12       | Adenocarcinoma de cólon                   | Fluorouracil e leucovorin                               |
| 13       | Carcinoma de esôfago                      | Fluorouracil e cisplatina                               |

|    |                         |                           |
|----|-------------------------|---------------------------|
| 14 | Adenocarcinoma de reto  | Fluorouracil e leucovorin |
| 15 | Adenocarcinoma de reto  | Fluorouracil e leucovorin |
| 16 | Adenocarcinoma de cólon | Fluorouracil e leucovorin |
| 17 | Adenocarcinoma de cólon | Fluorouracil e leucovorin |
| 18 | Adenocarcinoma de reto  | Fluorouracil e leucovorin |
| 19 | Adenocarcinoma de reto  | Fluorouracil e leucovorin |

### 3.1 Reagentes, enzimas e soluções

Os reagentes usados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Indústria Química Ltda, RJ). Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O zimosan, vermelho neutro, vermelho fenol, nitroblue tetrazolium (NBT), xilenol laranja, hidroxitolueno butilado (BHT), albumina sérica bovina (BSA) e iodeto de propídeo (PI) foram provenientes da Sigma Chemical Co (St Louis, MO - EUA). Meio de cultura (RPMI 1640), antibiótico (penicilina e estreptomicina) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY - EUA). Anexina V proveniente da BD Biosciences (San Diego, CA - EUA). As cápsulas de óleo de peixe foram cedidas gentilmente pela Fundação Herbarium®, contendo 1g/cápsula na proporção de 0,192 g de EPA e 0,124g de DHA. O material radioativo - [2 - 14C]-timidina (50 mCi/mmol) - foi obtido da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company - Biotechnology Systems - EUA).

### 3.2 Coleta e separação das células sanguíneas

O sangue dos pacientes foi coletado em tubos para coleta de sangue a vácuo K<sub>3</sub> EDTA não siliconizados (BD Minas Gerais, Brasil). O isolamento de neutrófilos foi realizado conforme proposto por BØYUM, 1976. O sangue foi centrifugado no próprio tubo a 153 g a 18 °C por 10 minutos. O plasma foi separado e o restante do sangue, transferido para tubo tipo falcon de 50 mL, acrescentando-se o mesmo volume em PBS. Em tubos contendo 3 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia)

foi acrescentado 8 mL do sangue diluído em PBS. Os tubos foram centrifugados a 400 *g* a 18 °C durante 40 minutos. A camada superior transparente foi desprezada. A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo (FIGURA 6). Submeteu-se a amostra duas vezes à lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris Base (tris[hidroximetil]aminometano) 17,0 mM e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  18,7 mM) em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. A solução foi centrifugada a 153 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspendidas em PBS e contadas em câmara de Neubauer. Depois de isoladas, as células polimorfonucleares, representadas em sua maioria por neutrófilos, (valor determinado por microscopia óptica do material corado por May-Grünwald Giemsa) possibilitando a obtenção de 90% de neutrófilos. À viabilidade foi determinada através da coloração de Tripán (0,2% em PBS) e foi maior que 95%.

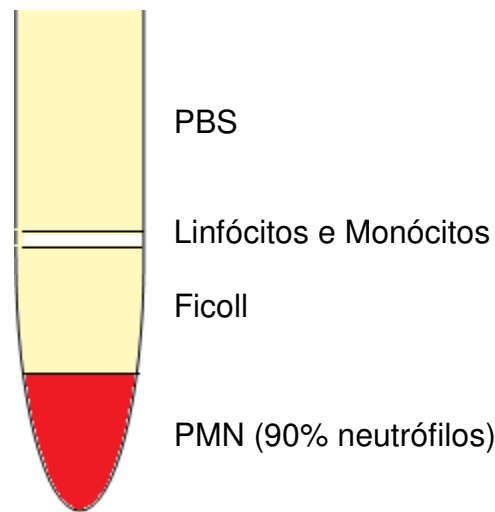


FIGURA 6: Esquema da separação de células sanguíneas em Ficoll-Paque.

### 3.3 Determinação de parâmetros de resposta imunitária em neutrófilos

#### 3.3.1 Soluções

O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% w/v e acetato de cálcio 1% w/v). A solução de extração consistiu de ácido

acético glacial 96% (1% v/v) e etanol (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. A solução estoque do corante vermelho neutro foi preparada pela solubilização de 0,02 g de corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 0,3 mL da solução estoque e 0,02 g de zimosan não-opsonizado ( $2,3 \times 10^8$  partículas/mL) em 3 mL de PBS para os ensaios de capacidade fagocítica.

### **3.3.2 Atividade fagocitária**

Foi utilizado o método descrito por PIPE *et al.*, 1995, modificado. Foram depositados 100  $\mu$ L da solução de neutrófilos, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, obtidos como descrito acima, em placa de 96 escavações. Em seguida se adicionou 10  $\mu$ L de zimosan ( $2,3 \times 10^8$  partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100  $\mu$ L de fixador de Baker, para interromper o processo de fagocitose e, 30 minutos posteriormente, a placa foi centrifugada, por 5 minutos a 240 g, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos neutrófilos. O vermelho neutro no interior dos neutrófilos foi solubilizado utilizando-se 100  $\mu$ L de solução de extração. Após 30 minutos se procedeu a leitura das placas, a 550 nm utilizando leitor de microplaca (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos por absorbância/ $10^6$  células/mL.

### **3.3.3 Produção de peróxido de hidrogênio**

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL, 1981, modificado. Através da oxidação de vermelho fenol, pela peroxidase, foi possível detectar a produção de  $H_2O_2$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L de solução de neutrófilos, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, e 10  $\mu$ L de 13-acetato 12-miristato de forbila (PMA – 4  $\mu$ M) foram colocados em placas tipo ELISA. Cada orifício recebeu 100  $\mu$ L da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zimosan. Foi

incubado durante 30 minutos, no escuro a 37 °C e, em seguida colocou-se 10 µL de NaOH 1 M e, após foi feita a leitura em leitor de microplaca a 595 nm (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados foram determinados a partir de uma curva padrão ( $r = 0,9987$ ) e, expressos em  $\mu\text{mol}/10^6$  células/mL.

### 3.3.4 Mensuração do ânion superóxido

A geração de superóxido foi estimada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Os neutrófilos contidos em 100 µL ( $1 \times 10^6$  células/mL), foram incubados por 1 hora, em placa de 96 escavações, contendo 0,2% de NBT e 10 µL de PMA (4 µM) em PBS a 37 °C. Neste passo, ocorre a redução do NBT a um composto azul e insolúvel no PBS, denominado formazan, numa reação promovida pelo ânion superóxido. Após, a placa foi centrifugada a 240 g por 5 minutos, o conteúdo foi desprezado, e se adicionou 100 µL de metanol 50%, para fixar os neutrófilos. Após 10 minutos a placa foi centrifugada novamente e o conteúdo desprezado, e seco com ar quente. Então se adicionou 120 µL de KOH, 2M e 140 µL de DMSO (dimetil sulfóxido) para solubilizar o NBT. Após 30 minutos se procedeu a leitura das placas, a 550 nm utilizando leitor de microplacas (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos por absorbância/ $10^6$  células/mL.

### 3.4.5 Volume das vesículas de secreção

Para esta análise se utilizou o método descrito por PIPE *et al.*, 1995, onde em placa de 96 escavações depositou-se 100 µL da solução de neutrófilos, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL e, se adicionou 20 µL da solução estoque de vermelho neutro (20 mg de vermelho neutro em 1 mL de DMSO) a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 240 g e o sobrenadante foi descartado. Então, se adicionou 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava no interior das vesículas de secreção. Esta solubilização é possível porque o vermelho



neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente nas vesículas de secreção, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando leitor de microplacas (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos por absorvância/ $10^6$  células/mL.

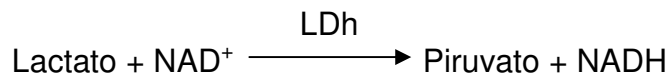
### **3.5 Parâmetros bioquímicos plasmáticos**

#### **3.5.1 Mensuração plasmática de lipídios**

A concentração plasmática de triacilgliceróis (TAG) e colesterol total e HDL colesterol foram determinadas por métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando os kits triglicérides GPO-Trinder e colesterol total Bioliquid, conforme especificações do fabricante. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm e os resultados estão expressos em mg/dL.

#### **3.5.2 Mensuração plasmática do lactato**

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES, 1978. Inicialmente fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 17.000 g. Em seguida, foi coletado 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionado 2  $\mu$ L de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100  $\mu$ L do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão de ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de  $\text{NAD}^+$  com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra, segundo a reação:



A partir da medida da absorbância, foi calculada a concentração do lactato sérico em  $\mu\text{mol/mL}$ , pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{Abs}}{6,22} + \frac{V1}{V} + \frac{V2}{V3} + \frac{V4}{V5}$$

Sendo:

[Lactato] = concentração de lactato produzida

Abs = absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteinizado

| Tampão de Ensaio (para 100 mL de H <sub>2</sub> O miliQ) |         |
|--|---------|
| EDTA   | 0,28 g  |
| Glicina  | 2,8 g   |
| Hidrato de hidrazina                                     | 1,5 mL  |
| LDh  | 0,4 mL  |
| NAD <sup>+</sup>   | 0,060 g |
| pH 8,85  |         |

### **3.6 Determinação do conteúdo de ácidos graxos presentes no plasma, neutrófilos e células tumorais**

#### **3.6.1 Extração lipídica**

Foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por FOLCH *et al* (1957). As amostras de células ( $10^6$  /mL) foram sonicadas (6 ciclos de 6 segundos). Em seguida foram adicionados 0,5 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 1500 g, 2 minutos, 4°C. A fase inferior foi transferida para outro tubo, e com a fase superior foi realizada nova extração com 0,5mL de metanol e 1mL de clorofórmio. Ao total de fases inferiores coletado das 2 extrações foi adicionado 1mL da solução de clorofórmio:metanol:água, na proporção de 3:47:48 (solvente de Folch). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi evaporada com nitrogênio gasoso.

#### **3.6.2 Saponificação dos extratos lipídicos**

Os extratos lipídicos obtidos dos tumores, bem como alíquotas de óleo de peixe e plasma, foram ressuspensos em 100 µL de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37°C por 2 horas, em banho-maria com agitação (BEYER & JENSEN, 1989; HAMILTON *et al*, 1992; NISHIYAMA-NARUKE *et al*, 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras então guardadas protegidas da luz, a -20°C, até a derivatização com BMMC.

### 3.6.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por ABUSHUFA *et al.*, 1994. O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonificado por 30 minutos e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8°C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 mL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados 100 µL do reagente 1, e 100 µL do reagente 2. As amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas a 60°C por 15 minutos, e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de volumes que variaram de 10 a 50µL dos derivados diluídos. O fluxo foi de 1,0mL/minuto, à temperatura controlada de 23°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325nm e emissão a 398nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77 : 23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90 : 10, em um total de 55 minutos.

### 3.6.4 Análise de ácidos graxos por HPLC

Após extração lipídica, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos obtidos, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC – Varian modelo LC-10A e detector de fluorescência (325 nm de excitação e 395 nm de emissão). A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi C-8 de fase reversa (25 cm × 4,6 mm i.d., 5 µm de partícula), com um fluxo de 1mL/min de acetonitrila/água (73:23, vol/vol). A mistura de padrões de ácidos graxos foi obtida da empresa Sigma-Aldrich.

### **3.7 Avaliação de células tumorais**

#### **3.7.1 Obtenção de células tumorais**

Os tumores foram obtidos de cirurgias de ressecção realizadas no Hospital Angelina Caron. As amostras cirúrgicas foram acondicionadas em recipientes contendo meio de cultura RPMI 1640 e antibiótico a 0,1 % (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L). Após, em câmara de fluxo laminar, as amostras foram maceradas e submetidas à filtragem, de modo a obter uma solução de células. Em seguida, esta solução foi acondicionada em garrafas de cultivo, para a adesão de macrófagos. Após 1 hora, a amostra foi centrifugada (153 g por 7 minutos) e adicionou-se solução de hemólise. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio de cultivo RPMI 1640, com soro fetal bovino a 10% e antibiótico. Procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer, para a determinação do número de células.

#### **3.7.2 Complexação do óleo de peixe à albumina**

O óleo de peixe foi complexado a albumina sérica bovina (BSA) a 2% em meio RPMI-1640 filtrada (2 µm) sob condições estéreis por um período de 24 horas na proporção de 1:10. Após este período, as gotículas de gordura não complexadas foram retiradas com auxílio de pipeta tipo Pasteur e a solução armazenada em geladeira.

#### **3.7.3 Cultivo das células**

Células tumorais,  $2 \times 10^5$  células por poço, foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, contendo 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L) e 20 µL solução ( $2\text{-}^{14}\text{C}$ )- timidina (0,02 µCi/poço) em placas de 96 poços (volume final de 200 µL), a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 05% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. As células foram cultivadas na ausência (BSA 2% ou meio RPMI) ou presença de 25 µL de óleo de peixe-BSA complexado. Após 24 horas, as células tumorais foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron

Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação (ECOLUME-ICN) e mensurados em contador Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm).

#### **3.7.4 Peroxidação lipídica**

Foram cultivadas  $2 \times 10^6$  células por poço em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 6 poços (volume final de 4 mL), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 05% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. As células foram cultivadas com óleo de peixe-BSA complexado ou veículo (BSA 2%) ou meio RPMI contendo SFB e antibiótico. Utilizou-se 1 mL de células ( $1 \times 10^6$  células/mL), adicionado de 2,5 mL de meio de cultura RPMI contendo SFB e antibiótico e 500 µL de óleo de peixe BSA complexado ou de BSA 2% ou de meio. Após 24 horas, as células foram coletadas das placas e transferidas para tubos de 15 mL, os quais foram centrifugados a 340 g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com tampão fosfato salina (PBS). O sedimentado foi ressuspenso em 5 volumes de PBS e congelado para posterior análise. A taxa de peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994. Para cada amostra, alíquotas de 90 µL do sobrenadante foram postas em 6 tubos eppendorf. A três destes tubos foram adicionados 10 µL de solução metanólica de trifenílfosfina (TPP, Sigma) 10 mM, para ocorrer à redução seletiva de hidroperóxidos (os grupamentos hidroperóxidos, especificamente os presentes em lipídios, são convertidos a grupamentos hidroxila pela trifenílfosfina) (FIGURA 7). As amostras contidas nos três tubos restantes receberam apenas 10 µL de metanol. Todos os tubos foram agitados vigorosamente e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

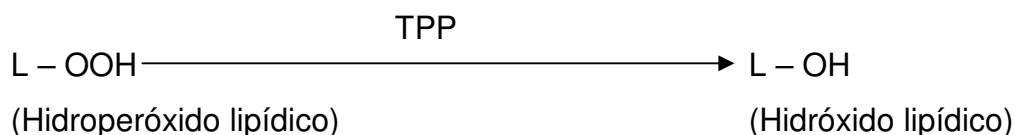


FIGURA 7: Representação simplificada da redução de hidroperóxidos lipídicos pela trifenilfosfina (TPP).

Terminada a incubação, adicionou-se a cada tubo 900  $\mu\text{L}$  do reagente de FOX2. Este reagente deve ser preparado no momento do uso, consistindo de xilenol laranja 100 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 4 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250  $\mu\text{M}$ , em metanol 90% (v:v em água). Após agitação, com o meio reacional foi incubado a temperatura ambiente por mais 30 minutos. Nesta etapa, os cátions ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) do reativo de FOX2 são oxidados pelos hidroperóxidos presentes na amostra (tanto pelos hidroperóxidos lipídicos quanto por outros tipos de hidroperóxidos presentes na amostra). Como todos os hidroperóxidos lipídicos das amostras tratadas com TPP foram reduzidos, a produção de  $\text{Fe}^{2+}$  será menor nestas amostras do que nas amostras não tratadas com TPP.

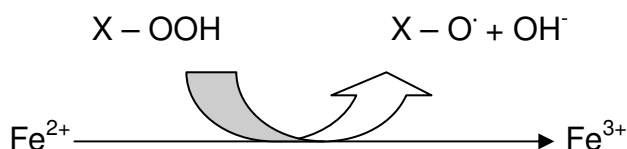


FIGURA 8: Oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  promovida por hidroperóxidos ( $\text{X} - \text{OOH}$ ).

O  $\text{Fe}^{3+}$  formado então pelo xilenol laranja, faz a cor deste indicador passar de laranja a azul-púrpura. Passado o tempo de incubação, a absorbância foi mensurada a 560 nm. Subtraiu-se o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorbância sem TPP. O valor obtido por essa subtração, referente apenas à quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos, foi utilizado na fórmula da curva padrão de peróxidos de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,6  $\mu\text{M}$ ) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). O resultado obtido foi referente

à concentração de hidroperóxidos lipídicos. Dividiu-se o valor da concentração de proteínas (mensurada pelo método de BRADFORD, 1976) totais do extrato metanólico. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteínas.

### **3.7.5 Determinação da apoptose por citometria de fluxo**

Foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células tumorais por poço, em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com SFB e antibióticos, com óleo de peixe-BSA complexado ou veículo (BSA 2%) ou meio RPMI, em placas de 6 poços (volume final de 4 mL), como descrito acima. Após 24 h, as células foram coletadas das placas e transferidas para tubos de 15 mL, os quais foram centrifugados a 1200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com tampão fosfato salina (PBS). O sedimentado foi ressuspensionado em tampão de ligação contendo Hepes/NaOH 10 mM (pH7,4), NaCl 140 mM e  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM. Colocou-se então 100  $\mu\text{L}$  desta solução em um tubo próprio para utilização em citômetro e adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de anexina V. As amostras foram agitadas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Após este período, mais 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação foram adicionados e as amostras lidas em citômetro de fluxo. Os dados estão apresentados na forma de gráficos e foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8.

### **3.7.6 Quantificação protéica**

A quantificação protéica foi feita pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base em curva padrão de proteína conhecida (albumina sérica bovina).



### **3.8 Análise Estatística**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de Tukey com significância para  $p < 0,05$ . A significância de dois grupos diferentes foi determinada por teste t de Student. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA).

#### 4. RESULTADOS SOBRE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS E DE CAQUEXIA

Os dados biométricos gerais dos pacientes sem suplementação e suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe, ao final de 8 semanas estão apresentados nas TABELAS 5 e 6, respectivamente. Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) nos pesos dos pacientes sem e suplementados com óleo de peixe, antes e ao final de 8 semanas.

TABELA 5: Dados biométricos gerais dos pacientes não suplementados.

| Paciente                                   | Idade                          | Altura<br>(m) | Gênero | Localização<br>do tumor | Massa<br>inicial<br>(kg)       | Massa<br>após 8<br>semanas<br>(kg) | Variação<br>de<br>massa<br>(kg) |
|--|--------------------------------|---------------|--------|-------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 01   | 61                             | Ni            | F      | Reto                    | 77,0                           | 79,0                               | 2                               |
| 02   | 76                             | 1,50          | F      | Reto                    | 73,0                           | 74,5                               | 1,5                             |
| 03   | 46                             | 1,53          | F      | Cólon                   | 47,5                           | 49,8                               | 2,3                             |
| 04   | 78                             | Ni            | M      | Cólon                   | 77,0                           | 68,5                               | -8,5                            |
| 05   | 72                             | Ni            | M      | Reto                    | 54,0                           | 51,0                               | -3                              |
| 06   | 40                             | 1,72          | F      | Cólon                   | 75,0                           | 71,0                               | -4                              |
| 07   | 60                             | 1,52          | F      | Reto                    | 58,0                           | 55,0                               | -3                              |
| 08   | 60                             | 1,69          | M      | Reto                    | 73,5                           | 70,5                               | -3                              |
| 09   | 36                             | 1,69          | M      | Reto                    | 72,0                           | 71,5                               | -0,5                            |
| 10   | 40                             | 1,70          | M      | Cólon                   | 64,5                           | 62,3                               | -2,2                            |
| 11   | 39                             | 1,63          | F      | Cólon                   | 69,5                           | 71,0                               | 1,5                             |
| 12   | 49                             | 1,63          | M      | Faringe                 | 80,0                           | 70,8                               | -9,2                            |
| 13   | 68                             | 1,43          | F      | Mama                    | 64,0                           | 65,0                               | 1                               |
| 14   | 55                             | 1,63          | F      | Esôfago                 | 51,5                           | 42,0                               | -9,5                            |
| 15   | 56                             | 1,75          | M      | Linfoma                 | 90,0                           | 87,5                               | -2,5                            |
| 16   | 74                             | 1,71          | M      | Laringe                 | 58,7                           | 60,0                               | 1,3                             |
| 17   | 41                             | 1,59          | F      | Útero                   | 75,0                           | 70,0                               | -5                              |
| 18   | 55                             | 1,80          | M      | Sem local.              | 113,0                          | 110,0                              | -3                              |
| 19   | 38                             | 1,60          | M      | Estômago                | 48,0                           | 45,0                               | -3                              |
| <b><math>\bar{X} \pm \text{EPM}</math></b> | <b>54,9<math>\pm</math>3,2</b> |               |        |                         | <b>69,5<math>\pm</math>3,6</b> | <b>67,1<math>\pm</math>3,6</b>     |                                 |

Ni= não informado no prontuário do paciente

TABELA 6: Dados biométricos gerais dos pacientes suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe, ao final de 8 semanas.

| Paciente                                   | Idade (anos)                    | Altura (m) | Gênero | Localização do tumor | Massa inicial (kg)              | Massa após 8 semanas (kg)       | Variação de massa (kg) |
|--|---------------------------------|------------|--------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 01   | 64                              | 1,75       | M      | Linfoma              | 71,0                            | 67,0                            | -4                     |
| 02   | 51                              | 1,65       | F      | Reto                 | 51,0                            | 63,0                            | 12                     |
| 03   | 44                              | 1,64       | M      | Laringe              | 49,0                            | 51,0                            | 2                      |
| 04   | 54                              | 1,67       | M      | Esôfago              | 66,0                            | 63,0                            | -3                     |
| 05   | 30                              | 1,80       | M      | Estômago             | 55,0                            | 56,0                            | 1                      |
| 06   | 50                              | 1,74       | M      | Faringe              | 55,0                            | 53,0                            | -2                     |
| 07   | 63                              | 1,59       | F      | Mama                 | 97,0                            | 97,0                            | 0                      |
| 08   | 54                              | 1,60       | F      | Útero                | 91,5                            | 91,5                            | 0                      |
| 09   | 68                              | 1,69       | M      | Estômago             | 64,0                            | 65,0                            | 1                      |
| 10   | 61                              | 1,55       | F      | Ovário               | 61,0                            | 63,5                            | 2,5                    |
| 11   | 49                              | 1,52       | F      | Cólon                | 53,0                            | 56,5                            | 3,5                    |
| 12   | 69                              | 1,58       | M      | Cólon                | 52,0                            | 51,5                            | -0,5                   |
| 13   | 53                              | 1,76       | M      | Esôfago              | 58,0                            | 52,5                            | -5,5                   |
| 14   | 69                              | 1,78       | M      | Reto                 | 85,0                            | 89,5                            | 4,5                    |
| 15   | 65                              | 1,66       | M      | Reto                 | 80,0                            | 83,5                            | 3,5                    |
| 16   | 42                              | 1,76       | M      | Cólon                | 53,5                            | 61,5                            | 8                      |
| 17   | 47                              | 1,56       | F      | Cólon                | 69,5                            | 74,0                            | 4,5                    |
| 18   | 41                              | 1,83       | M      | Reto                 | 90,0                            | 92,0                            | 2                      |
| 19   | 48                              | 1,58       | F      | Reto                 | 48,8                            | 52,0                            | 3,2                    |
| <b><math>\bar{X} \pm \text{EPM}</math></b> | <b>53,79<math>\pm</math>2,4</b> |            |        |                      | <b>65,81<math>\pm</math>3,6</b> | <b>67,43<math>\pm</math>3,5</b> |                        |

Na FIGURA 9 está representado, em percentagem, a variação de massa corpórea dos pacientes não suplementados (NS) e suplementados ao final de 8 semanas de todos os pacientes do estudo (38). Dos dezenove pacientes não suplementados, treze apresentaram redução de peso (68%) e seis ganharam peso (32%), não havendo nenhum paciente que mantivesse sua massa corpórea. Já na população suplementada, totalizando dezenove indivíduos, doze pacientes apresentaram ganho de peso (63%), dois mantiveram seus pesos (10,5%) e cinco apresentaram redução de peso (26%).

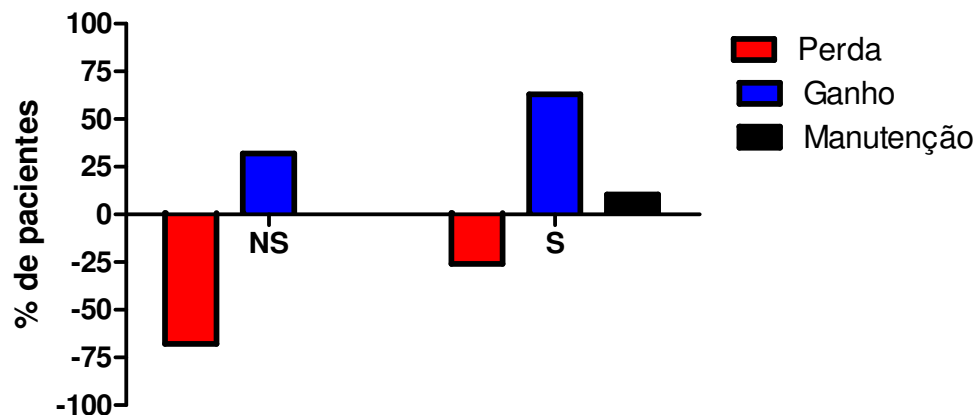


FIGURA 9: Percentagem (%) de pacientes que perderam (barra vermelha), ganharam (barra azul) ou mantiveram massa corpórea (barra preta), dos grupos sem suplementação (NS) e após 8 semanas de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe (S). Os dados representam no grupo NS 13 e 6 pacientes que perderam e ganharam massa, respectivamente; e 5, 12 e 2 pacientes do grupo S que perderam, ganharam e mantiveram massa corpórea, respectivamente.

Fagocitose de zimosan pelos neutrófilos obtidos do sangue dos pacientes no início do tratamento (T0 e T0 S), após 8 semanas sem (T8) e com suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe (T8 S). No grupo suplementado (T8 S) com óleo de peixe durante 8 semanas houve aumento na fagocitose de 1,14 vezes ( $p<0,05$ ) em relação ao início do tratamento. No grupo sem suplementação (T8) houve redução da fagocitose de 1,5 vezes ( $p<0,001$ ) quando comparado aos início do tratamento (T0). O tratamento com óleo de peixe (T8s) elevou a fagocitose em 1,87 vezes ( $p<0,0001$ ) quando comparado ao não suplementado (T8). Os dados foram expressos em absorbância (abs)/ $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

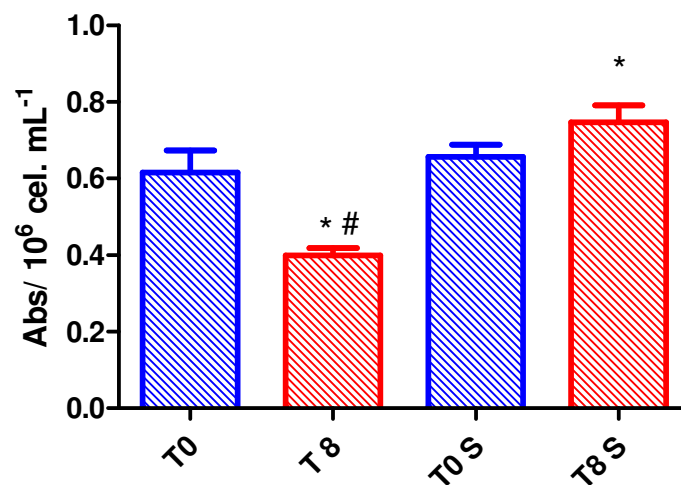


FIGURA 10: Fagocitose de zimosan pelos neutrófilos obtidos dos pacientes no início (T0 e T0 S) e após dois meses sem (T8) e com suplementação (T8 S) com óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes por grupo, sendo que cada experimento foi realizado em octuplicada.

\*  $p<0,05$  quando comparado ao início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S);

#  $p<0,0001$  quando comparado aos pacientes suplementados (T8 S).

Na FIGURA 11 observa-se a retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção pelos neutrófilos obtidos do sangue dos pacientes no início do tratamento (T0 e T0 S) e após 8 semanas sem (T8) ou com suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe (T8 S). Os neutrófilos do grupo não suplementado (T8) apresentaram menor retenção de vermelho neutro que foi 1,4 vezes menor ( $p < 0,05$ ) quando comparada aos demais grupos, T0, T0 S e T8 S. Os dados foram expressos em absorbância (abs)/ $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

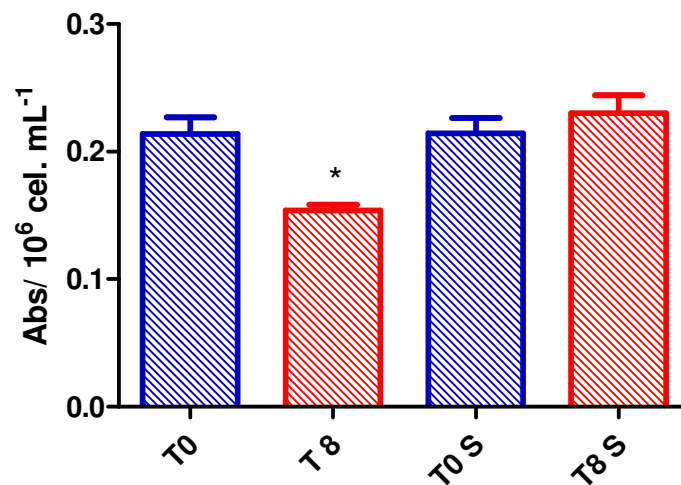


FIGURA 11: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e suplementados (T8 S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes em cada grupo, sendo que cada experimento foi realizado em octuplicada.

\*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos T0, T0 S e T8 S.

A produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pelos neutrófilos dos pacientes está representada na FIGURA 12. No grupo sem suplementação (T8) a produção não foi diferente daquela observada no início do tratamento (T0 e T8 S). No grupo suplementado (T8 S) houve aumento de 1,3 vezes da produção de  $O_2^-$  quando se comparada à dos pacientes no início do tratamento (T0 e T0 S) e de 1,1 vezes quando comparada à dos pacientes sem suplementação (T8). Os dados foram expressos em absorbância (abs)/ $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

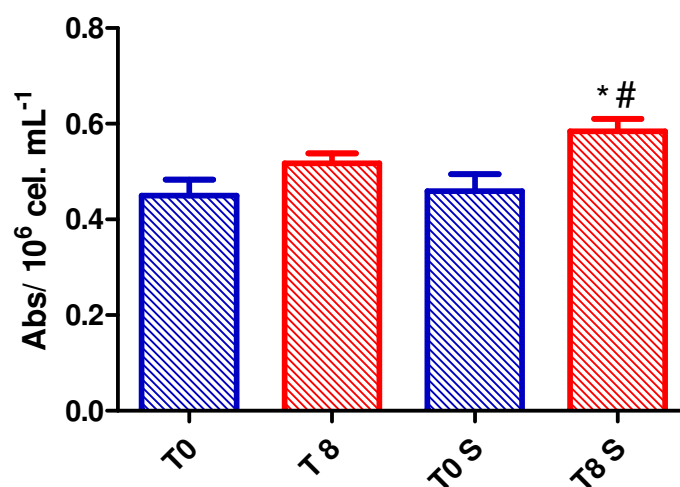


FIGURA 12: Produção do ânion superóxido por neutrófilos dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e suplementados (T8 S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes por grupo, sendo que cada experimento foi realizado em octuplicada.

\*  $p < 0,05$  quando comparado a antes do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S);

#  $p < 0,05$  quando comparado aos pacientes sem suplementação (T8).

A produção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pelos neutrófilos obtidos dos pacientes, está apresentada na FIGURA 13. No grupo suplementado durante 8 semanas com óleo de peixe (T8 S), a produção de  $H_2O_2$  não foi diferente ( $p>0,05$ ) quando comparada ao início do tratamento (T0 S). Já no grupo não suplementado (T8) a produção de  $H_2O_2$  foi 1,4 vezes menor quando comparada à dos pacientes no início do tratamento e após 8 semanas de tratamento ( $p<0,05$ ). Os dados foram expressos em absorbância  $\mu\text{M}/10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ .

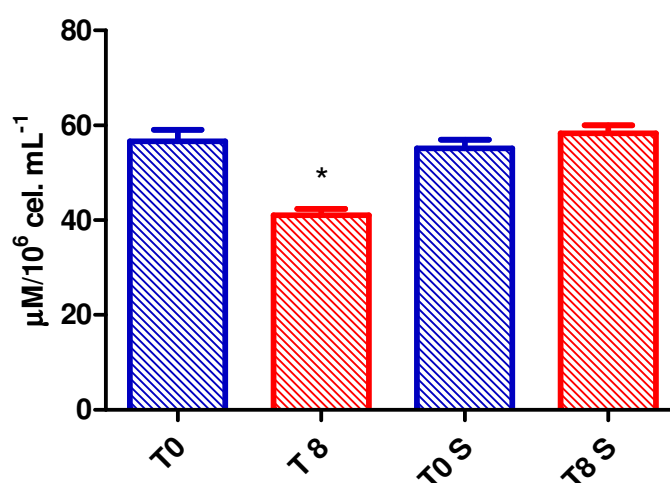


FIGURA 13: Produção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por neutrófilos dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e suplementados (T8 S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes por grupo, sendo que cada experimento foi realizado em octuplicada.

\*  $p<0,05$  quando comparado a antes do tratamento quimioterápico e aos pacientes suplementados;



A concentração dos ácidos graxos poliinsaturados eicosapentaenóico (EPA), docosaexaenóico (DHA) e araquidônico (AA), nos neutrófilos dos pacientes, representada em porcentagem do total de ácidos graxos, está apresentada na FIGURA 14. No início da suplementação, a concentração de EPA-0, DHA-0 e AA-0 (%) foi de 0,65, 0,27 e 6,43, respectivamente. Ao final de 8 semanas a concentração de EPA-8 e DHA-8 foi de 1,07 e 0,52, aumento de 1,6 e 1,9, respectivamente. Em contraste, a concentração de AA-8 foi de 5,15, redução de 1,25 vezes. Todos os incrementos e redução foram significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao início da suplementação. A análise do perfil lipídico dos neutrófilos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 pacientes.

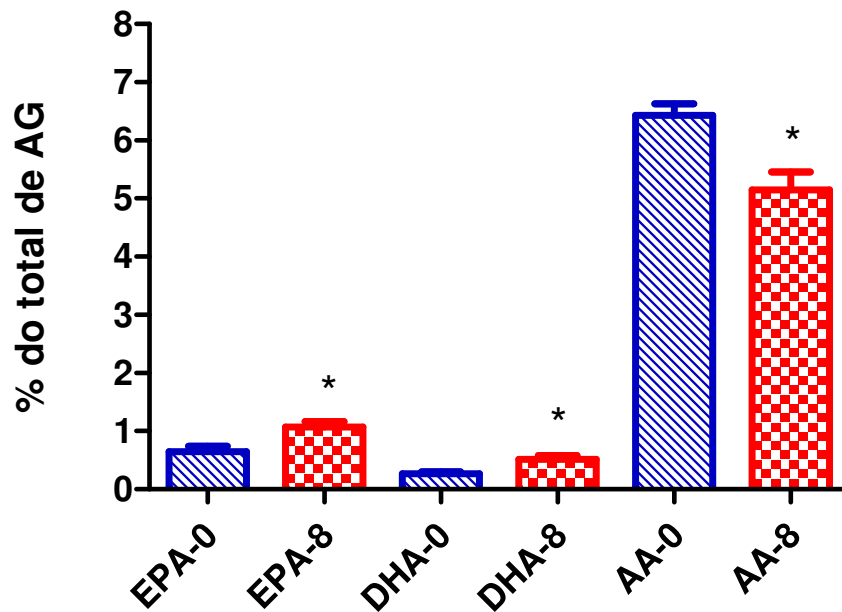


FIGURA 14: Concentração dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (AA), em porcentagem do total de ácidos graxos, nos neutrófilos de pacientes no início (-0) e após 8 semanas (-8) de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 pacientes.

\* $p < 0,05$  quando comparado ao início da suplementação (zero).

Na FIGURA 15 está representada a relação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) eicosapentaenóico (EPA) e araquidônico (AA) nos neutrófilos. No início do tratamento quimioterápico (zero) e após 8 semanas de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 pacientes.

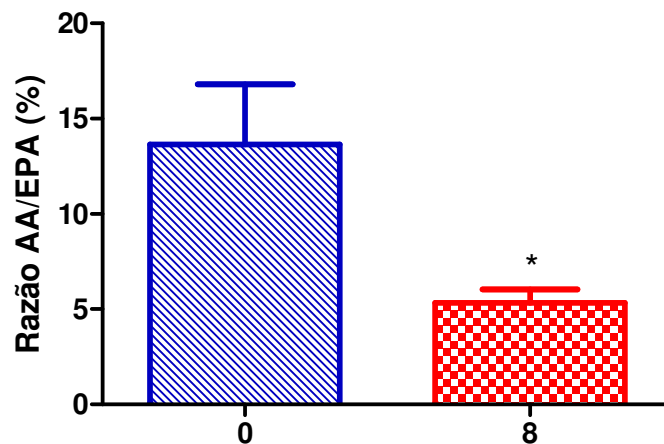


FIGURA 15: Razão entre ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) araquidônico (AA) e eicosapentaenóico (EPA) em neutrófilos. Sendo zero o início do tratamento quimioterápico e 8 semanas de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 pacientes.

\* $p < 0,001$

Na FIGURA 16 observa-se a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI): eicosapentaenóico (EPA), docosaexaenóico (DHA) e araquidônico (AA). No plasma dos pacientes antes da suplementação (zero) e após 8 semanas de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe. Quando se compara o início com o final da suplementação observa-se aumento de 3,2 vezes do EPA, 2,7 vezes do DHA e, redução de 2 vezes no AA. A análise do perfil lipídico do plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados representam a média de  $\pm$  EPM 7 pacientes.

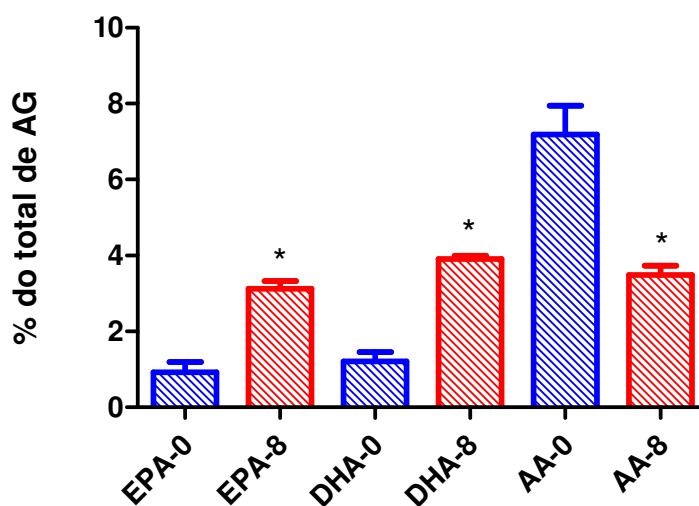


FIGURA 16: Porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (AA) no plasma de pacientes no início do tratamento quimioterápico (0) e suplementados por 8 semanas (8) com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 7 pacientes.

\* $p < 0,001$  quando comparado ao início (zero) da suplementação.

Na FIGURA 17 está representada a razão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) araquidônico (AA) e eicosapentaenóico (EPA) no plasma. Sendo o início do tratamento quimioterápico (0) e após 8 semanas de suplementação (8) com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 7 pacientes.

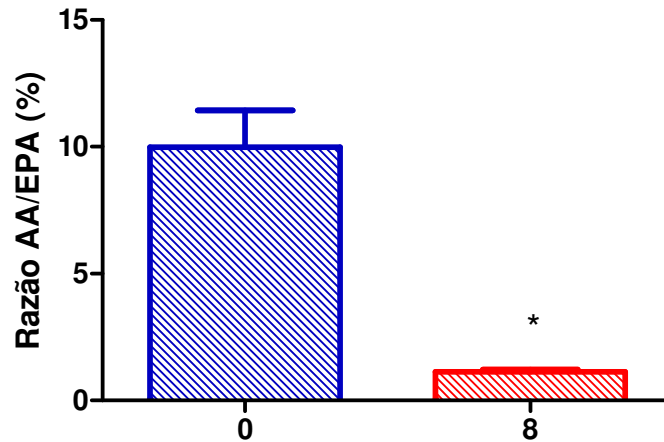


FIGURA 17: Relação entre ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) araquidônico (AA) e eicosapentaenóico (EPA) no plasma. Sendo zero o início do tratamento quimioterápico e 8 representando 8 semanas de suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 7 pacientes.

\* $p < 0,0001$

Na FIGURA 18 observa-se a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI): eicosapentaenóico (EPA), docosaexaenóico (DHA) e araquidônico (AA). No plasma dos pacientes antes da suplementação (zero) e após 8 semanas. Não se observou alterações significativas ( $p>0,05$ ) nas concentrações de AGPI no plasma destes indivíduos. A análise do perfil lipídico do plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados representam a média de  $\pm$  EPM 5 pacientes.

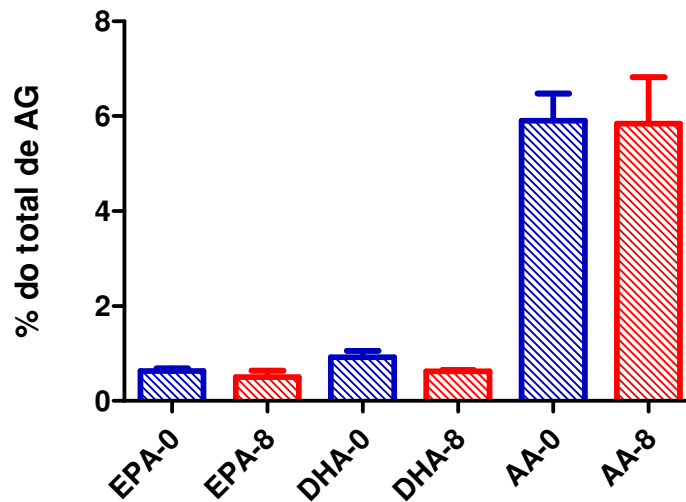


FIGURA 18: Porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (AA) no plasma de pacientes no início do tratamento quimioterápico (0) e após 8 semanas (8). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 pacientes.

Composição lipídica (%) contida nas cápsulas de óleo de peixe consumidas pelos pacientes durante as 8 semanas TABELA 7. A concentração de EPA e DHA foi encontrada em maior concentração, 20,2 e 18,8 %, respectivamente. O total de ácidos graxos saturados correspondeu a 40,6% e a 59,4 representando o total de ácidos graxos poliinsaturados. Da família ômega-3 encontramos 39,7%; de ômega-6 foi de 2,9%; de ômega-7 foi de 6,5% e ômega-9 foi de 10,2%.

TABELA 7: Composição das cápsulas de óleo de peixe utilizado na suplementação dos pacientes. Os dados representam a media  $\pm$  EPM de 4 amostras.

| <b>Ácido graxo</b>             | <b>Óleo de peixe (%)</b>       |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Láurico (12:0)</b>          | <b>3,4<math>\pm</math>0,7</b>  |
| <b>Mirístico (14:0)</b>        | <b>9,8<math>\pm</math>0,4</b>  |
| <b>Palmítico(16:0)</b>         | <b>25,3<math>\pm</math>3,0</b> |
| <b>Esteárico (18:0)</b>        | <b>2,1<math>\pm</math>0,1</b>  |
| <b>Palmitoléico (16:1 n-7)</b> | <b>6,5<math>\pm</math>0,1</b>  |
| <b>Oléico (18:1 n-9)</b>       | <b>10,2<math>\pm</math>0,9</b> |
| <b>Linoléico (18:2 n-6)</b>    | <b>2,0<math>\pm</math>0,2</b>  |
| <b>Linolênico(18:3 n-3)</b>    | <b>0,7<math>\pm</math>0,2</b>  |
| <b>Araquidônico(20:4 n-6)</b>  | <b>0,9<math>\pm</math>0,2</b>  |
| <b>EPA (22:5 n-3)</b>          | <b>20,2<math>\pm</math>1,3</b> |
| <b>DHA (22:6 n-3)</b>          | <b>18,8<math>\pm</math>1,2</b> |

A concentração de colesterol plasmático (mg/dL) dos pacientes antes (T0 e T0 S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação (T8 S) com 2 g/dia de óleo de peixe está apresentada na FIGURA 19. No início da quimioterapia antineoplásica no grupo (0), a concentração de colesterol nos pacientes foi de  $162,4 \pm 14,5$ . Após oito semanas sem suplementação (T8), a colesterolemia elevou-se no plasma destes pacientes para  $196,3 \pm 10,2$ , contudo não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Nos pacientes suplementados com óleo de peixe (T8 S), a colesterolemia foi de  $154,4 \pm 9,5$ . Esta quando comparada à dos pacientes no início da suplementação (T0) não foi diferente significativamente, contudo foi 1,2 vezes menor ( $p < 0,05$ ) quando comparada à dos pacientes não suplementados (T8).

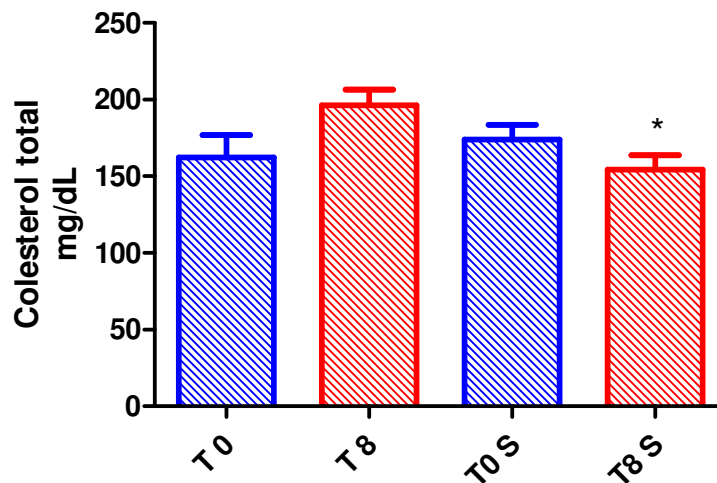


FIGURA 19: Colesterolemia (mg/dL) dos pacientes antes (0) e após dois meses sem (T8) e com suplementação com 2g/dia de óleo de peixe (T8S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes, onde cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo sem suplementação (T8).

A concentração de triacilglicerol (mg/dL) no plasma dos pacientes antes (T0 e T0 S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação (T8S) com 2 g/dia de óleo de peixe está apresentada na FIGURA 20. No início do tratamento antineoplásico (T0), a concentração de triacilglicerol nos pacientes foi de  $144,6 \pm 19,6$ . Após oito semanas sem suplementação (T8), a triacilglicerolemia elevou-se no plasma destes pacientes para  $170,7 \pm 12,2$ , contudo não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Nos pacientes suplementados com óleo de peixe (T8S), a triacilglicerolemia foi de  $131,3 \pm 10,4$ . Esta quando comparada à dos pacientes no início da suplementação (T0S)  $134,4 \pm 12,8$  não foi diferente significativamente, contudo foi 1,3 vezes menor ( $p < 0,05$ ) quando comparada à dos pacientes não suplementados (T8).

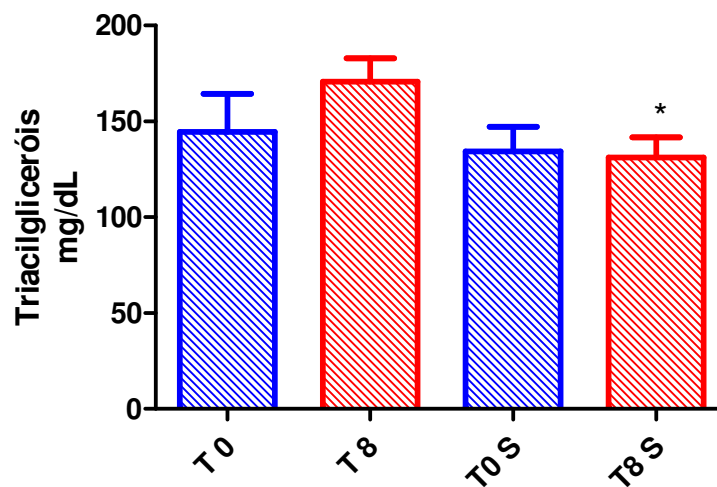


FIGURA 20: Triacilglicerolemia (mg/dL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo sem suplementação (T8).



A concentração de colesterol-HDL (mg/dL) no plasma dos pacientes antes (T0 e T0 S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação (T8S) com 2 g/dia de óleo de peixe está apresentada na FIGURA 21. No início da quimioterapia (T0), a concentração de HDL-colesterol nos pacientes foi de  $35,2 \pm 4,7$ . Após oito (8) semanas sem suplementação (T8), a HDL-colesterolemia destes pacientes foi de  $33,9 \pm 5,2$ , a qual não foi diferente ( $p>0,05$ ) da obtida no tempo zero (0). Nos pacientes suplementados com óleo de peixe no início da suplementação (T0 S) a concentração de HDL foi  $30,6 \pm 3,2$  e após oito semanas (T8S), a HDL-colesterolemia foi de  $44,5 \pm 4,5$  que correspondeu a uma elevação de 1,3 vezes ( $p<0,05$ ) quando comparada aos demais grupos.

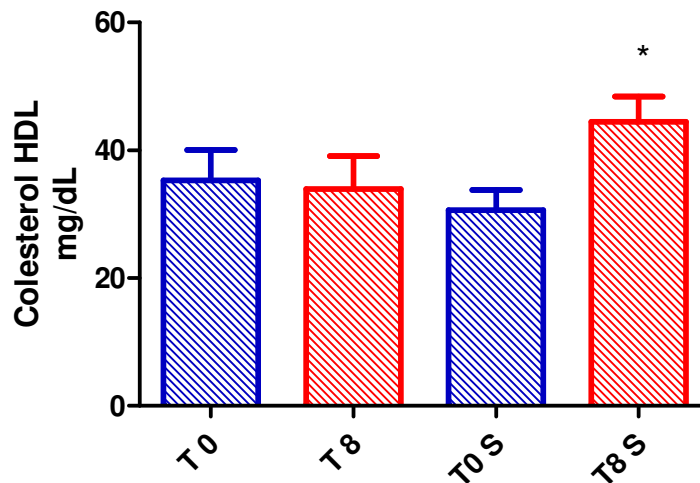


FIGURA 21: Colesterol HDL (mg/dL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados (T8 S) com 2g/dia de óleo de peixe. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p<0,05$  quando comparado aos grupos T0, T8 e T0S.

A concentração de colesterol-LDL (mg/dL) no plasma dos pacientes antes (T0 e T0 S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação (T8 S) com 2 g/dia de óleo de peixe está apresentada na FIGURA 22. No início do tratamento antineoplásico (T0), a concentração de LDL-colesterol nos pacientes foi de  $105,8 \pm 11,2$ . Após oito semanas sem suplementação (T8), a LDL-colesterolemia destes pacientes foi de  $127,0 \pm 10,7$  a qual não foi diferente ( $p > 0,05$ ) da obtida no tempo zero (T0). Nos pacientes suplementados com óleo de peixe no período T0 S a concentração de LDL foi de  $109,6 \pm 7,1$  e no grupo T8S, a LDL-colesterolemia foi de  $96,3 \pm 29,9$  que correspondeu a uma redução de 1,3 vezes ( $p < 0,05$ ) quando comparada à dos pacientes sem suplementação (T8).

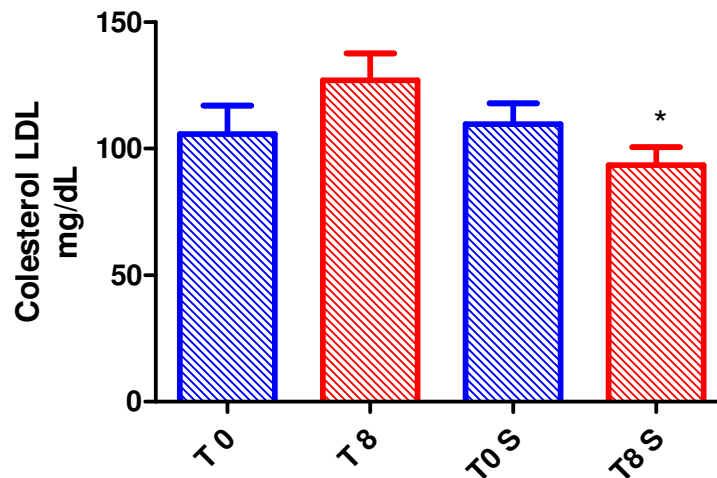


FIGURA 22: Colesterol LDL (mg/dL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado a T8.

A concentração de colesterol VLDL (mg/dL) no plasma dos pacientes antes (T0 e T0S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação (T8s) com 2 g/dia de óleo de peixe está apresentada na FIGURA 23. No início da suplementação (T0), a concentração de VLDL-colesterol no plasma dos pacientes foi de  $29,1 \pm 4,6$ . Após oito semanas sem suplementação (T8), a VLDL-colesterolemia destes pacientes elevou-se para  $35,8 \pm 3,2$ , mas não foi diferente ( $p > 0,05$ ) da obtida no tempo zero. Nos pacientes suplementados com óleo de peixe no início da suplementação (T0S) a concentração de VLDL foi de  $26,1 \pm 2,6$  e após oito semanas (T8S), a VLDL-colesterolemia foi de  $25,0 \pm 1,3$  que correspondeu a uma redução de 1,4 vezes quando comparada à dos pacientes sem suplementação (T8), a qual foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ).

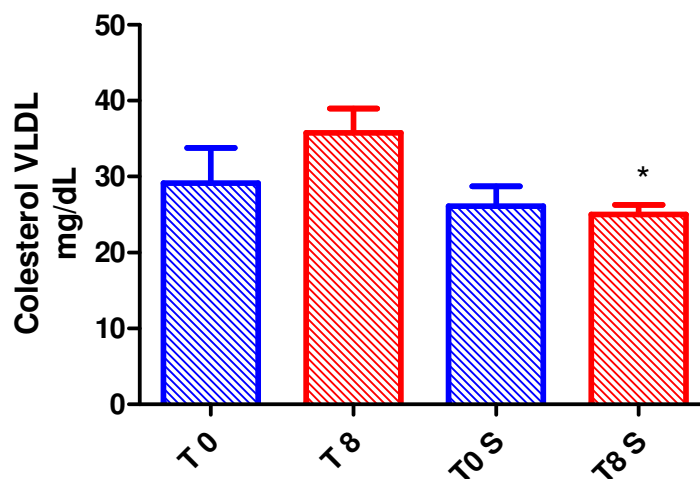


FIGURA 23: Colesterol VLDL (mg/dL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 19 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado a T8.

Na FIGURA 24 está apresentada a lactatemia (mmol/L) dos pacientes no início da suplementação (T0 e T0S) e após oito semanas sem (T8) e com suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe (T8S). No tempo zero (T0) a concentração de lactato plasmático dos pacientes foi de  $1,8 \pm 0,07$ . Após oito semanas o grupo não suplementado (T8) apresentou lactatemia de  $1,74 \pm 0,12$ , a qual não foi diferente ( $p>0,05$ ) quando comparada à dos pacientes no início da suplementação (T0). Os pacientes suplementados com óleo de peixe durante oito semanas apresentaram lactatemia ao final deste período de  $1,39 \pm 0,08$ , o qual foi 1,2 vezes menor quando comparada à dos pacientes que não foram suplementados bem como ao início da suplementação ( $p<0,05$ ).

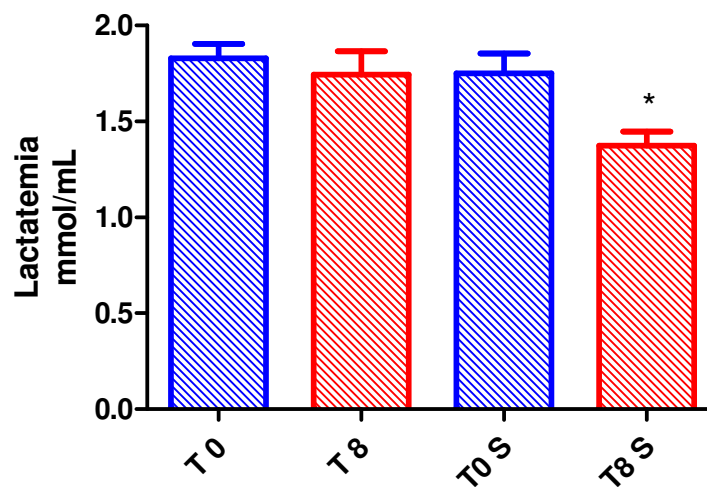


FIGURA 24: Lactatemia (mmol/mL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 14 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p<0,05$  quando comparado aos grupos T0, T8 e T0S.

Na FIGURA 25 está o número de neutrófilos ( $10^6/\text{mL}$ ) encontrados no sangue dos pacientes no início da suplementação (T0 e T0S) e após 8 semanas sem (T8) e com suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe (T8S). No tempo zero (início da suplementação) o número de neutrófilos foi de  $8,7 \pm 1,17$ . Após 8 semanas, no grupo não suplementado houve redução do número de neutrófilos para  $6,05 \pm 0,79$ , contudo não foi significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada ao tempo zero (0). A suplementação com óleo de peixe elevou o número de neutrófilos nos pacientes para  $9,59 \pm 1,36$ , a qual foi 1,6 vezes maior quando comparado ao dos pacientes não suplementados (T8) ( $p < 0,05$ ), entretanto não foi maior quando comparado ao início da suplementação (T0 e T0 S) ( $p > 0,05$ ).

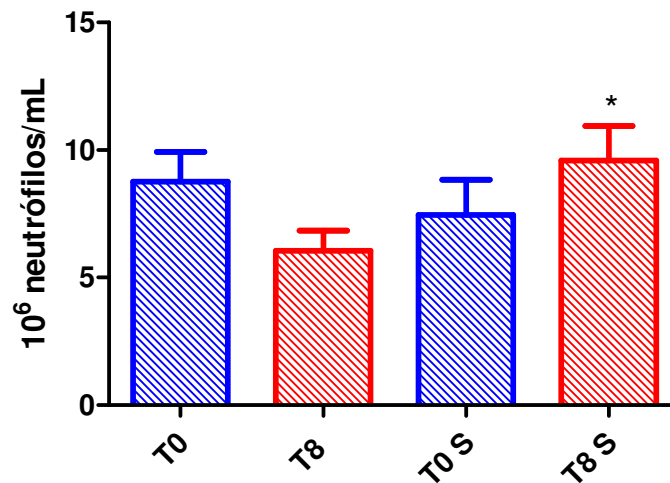


FIGURA 25: Número de neutrófilos ( $10^6/\text{mL}$ ) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0 S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8 S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 13 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo T8.

A FIGURA 26 mostra o número de linfócitos ( $10^6$  cel/mL) dos pacientes no início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), após 8 semanas de tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe (T8 S). Não ocorreram diferenças significativas no número de linfócitos dos pacientes estudados.

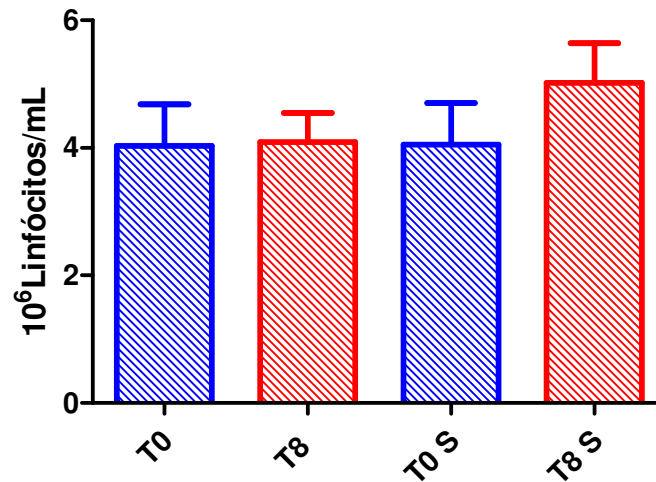


FIGURA 26: Número de linfócitos ( $10^6$  mL) dos pacientes antes do início do tratamento quimioterápico (T0 e T0S), dois meses após o tratamento quimioterápico sem suplementação (T8) e, suplementados com 2g/dia de óleo de peixe (T8 S). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 10 pacientes, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata.

#### 4 DISCUSSÃO SOBRE PARÂMETROS IMUNITÁRIOS E DE CAQUEXIA

Ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 constituem um grupo de nutrientes importantes para manter a homeostase em mamíferos e também são conhecidos como ácidos graxos essenciais, porque nosso corpo não consegue sintetizá-los (PESKIN & CARTER, 2008). Dietas ricas em AGPI n-3 têm efeitos em diversos processos fisiológicos, atuando em doenças crônicas, na regulação da lipídemia, em doenças cardiovasculares, no desenvolvimento neuronal, na modulação do sistema imunitário e no câncer (JUMP, 2002; BIONDO *et al.*, 2008). Os mecanismos moleculares de ação dos AGPI n-3 ainda não estão totalmente esclarecidos, porém algumas hipóteses tem sido aventadas de como poderiam atuar. Uma seria na modulação da membrana já que AGPI ao se incorporarem a esta poderia alterar a função celular. Dietas ricas, em AGPI do tipo n-3, são incorporadas as membranas em todas as células do corpo, que como consequência afetaria as interações proteínas/lipídios na organização da membrana (FIGURA 27), levando a modificação da pressão lateral, microviscosidade, curvatura, elasticidade e formação de microdomínios e assim afetando as funções protéicas (FELLER *et al.*, 2002; STILLWELL & WASSALL, 2003; WASSAL & STILLWELL, 2008). Outra seria no metabolismo de eicosanóides: estes são lipídios compostos por 20 carbonos e são mediadores de inflamação. O principal precursor dos eicosanóides é o ácido araquidônico (AA). Este é clivado pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> e serve como substrato para a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase (LOX), as quais produzem citocinas pró-inflamatórias. A ação anti inflamatória dos AGPI n-3 é pela competição do EPA (20:5 n-3) com o AA (20:4 n-6) pela COX e LOX, originando citocinas com menor potencial inflamatório ou mesmo gerar eicosanóides anti inflamatórios (SACKS & CAMPOS, 2006; SERHAN *et al.*, 2008). Finalmente, na expressão de genes: os AGPI n-3 podem atuar diretamente em receptores nucleares ou nas vias de sinalização. Os AGPI podem modificar diretamente a transcrição gênica ou interagir com proteínas ligantes do elemento regulatório esteroide, receptor X do fígado ou com o receptor ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR), influenciando assim nas vias de sinalização (SHAIKH & EDIDIN, 2008).

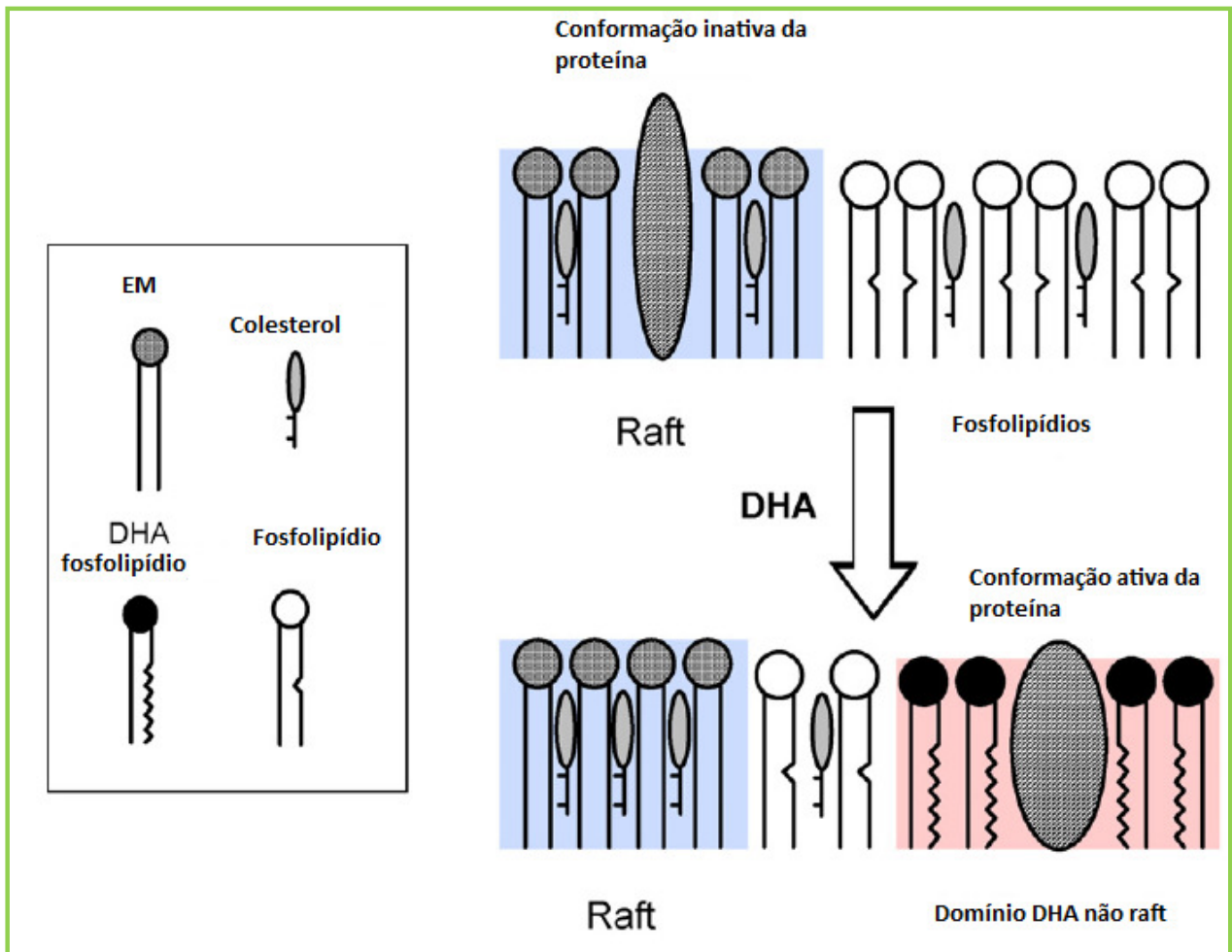


FIGURA 27: Esquema da incorporação de AGPI n-3, na membrana plasmática. Sendo EM = esfingomielina. Adptado de WASSAL & STILLWELL, 2008.

Os AGPI n-3 tem ação sistêmica e aqui procuramos identificar quais efeitos a suplementação com óleo de peixe rico, em AGPI n-3, teria nos neutrófilos, na lipidemia, na lactatemia e na massa de pacientes submetidos à quimioterapia para o tratamento do câncer. Existem poucos estudos clínicos nesta área e, a suplementação com AGPI n-3 melhora a eficácia das drogas usadas no tratamento quimioterápico em animais de experimentação (HARDMAN, 2004 e BIONDO *et al.*, 2008). Em nosso estudo participaram 38 pacientes todos sendo submetidos a tratamento quimioterápico anticâncer, em que um grupo recebeu suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante oito semanas (TABELA 6) e outro que não recebeu suplementação (TABELA 5). As características gerais destes grupos são semelhantes, onde os pacientes sem



suplementação constituíram o grupo controle. Uma característica bastante comum nos pacientes em tratamento de câncer é a perda de massa corpórea (GUIMARÃES *et al.*, 2002). Nossos pacientes tiveram preservação da massa corpórea durante o período experimental. Porém, uma análise compartimentalizada dos dados, do grupo suplementado, permitiu concluir que destes 19 pacientes, 12 pacientes apresentaram ganho de peso, dois mantiveram e cinco perderam peso (FIGURA 9). Este achado pode ser explicado pela ação anti caquética do óleo de peixe e não devido à ingestão de gordura (TOGNI *et al.*, 2003; PIZATO *et al.*, 2005; WIGMORE *et al.*, 1996 e por LLOYD *et al.*, 2008). FEARON, *et al.*, 2003, suplementaram pacientes portadores de câncer de pâncreas, em fase avançada e não ressectáveis, com uma dieta contendo 200 mg de EPA. Mostraram uma estabilização do peso dos pacientes, em comparação ao grupo controle. Já nos pacientes não suplementados também não foi observado alteração da massa corpórea contidos dos 19 pacientes, 13 pacientes perderam massa e apenas 6 ganharam massa (FIGURA 9).

Vários trabalhos tem mostrado que os AGPI n-3 tem a habilidade de modificar o sistema imunitário inato e adaptativo (BONATTO, 2004, CALDER *et al.*, 2002; CALDER 2001). Dentre os diferentes processos de defesa utilizados pelos neutrófilos estão a fagocitose, desgranulação e a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (WELCH, *et al.*, 1996; KAUR, *et al.*, 2004). A fagocitose é o processo de reconhecimento e englobamento de microorganismos ou resíduos de tecidos,  $\geq 0,5 \mu\text{m}$  de diâmetro (YEUNG *et al.*, 2006), que se acumulam durante uma infecção (FIGURA 28). Ainda, participam da remodelagem dos tecidos e na remoção de células senescentes (ADEREM & UNDERHILL, 1999; NIEDERGANG & CHAVRIER, 2004). Este processo se inicia com o reconhecimento do ligante a estrutura a ser fagocitada (KIM, *et al.*, 2003; STUART & EZEKOWITZ, 2008). Durante a endocitose ocorre a formação de um vacúolo, o fagossomo, geralmente, formado pela invaginação da membrana plasmática (RITTIG, *et al.*, 1999).

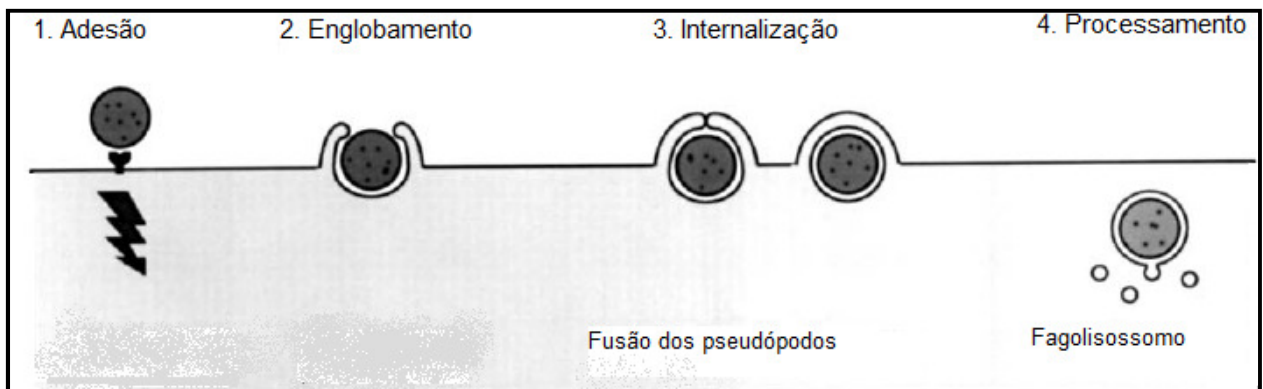


FIGURA 28: Processo de fagocitose, adaptado de RITTIG, *et al.*, 1999.

A atividade fagocitária pelos neutrófilos obtidos dos pacientes suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe, ao final de oito semanas, foi maior que a observada antes da suplementação e também a dos pacientes sem suplementação (FIGURA 10). Várias proteínas estão envolvidas no processo de fagocitose, como por exemplo as proteínas tirosina quinases (WELCH *et al.*, 1996), bem como lipídios da membrana (GAGNON *et al.*, 2002). Estudos utilizando membranas celulares, realizados na década 1980, levaram a descoberta do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) o qual era hidrolisado pela fosfolipase C (PLC) formando diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Paralelamente, sob a ação de enzimas, outros lipídios são liberados como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), sinalizador que regula o crescimento celular, proliferação e motilidade (WYMAN & SCHNEITER, 2008). Ambos identificados como segundo mensageiros para a ativação da proteína quinase C (PKC) e posterior liberação de Ca<sup>2+</sup> das reservas celulares. Portanto, como a ingestão de AGPI n-3 ou outro ácido graxo, leva a modificações no perfil lipídico nas membranas dos neutrófilos, podem alterar as respostas dos mesmos. Outra hipótese é levantada por YEUNG *et al.*, 2006, é que os receptores para fagocitose ficariam nos microdomínios de membrana, *rafts*, locais ricos em moléculas de colesterol, e como os AGPI n-3, presentes em grandes quantidades no óleo de peixe, deixam a membrana mais fluida, poderia haver alterações na atividade fagocitária.

Após a endocitose de substâncias, ocorre a formação do fagossomo, onde o patógeno será destruído, pela ação de enzimas lisossomais e das ROS. Os lisossomos

são organelas citoplasmáticas que contém grande quantidade de enzimas hidrolíticas (SZWEDA, *et al.*, 2002). Existem poucas informações sobre AGPI n-3 e vesículas de secreção (YEUNG *et al.*, 2006). Para estudarmos o sistema lisossomal, analisou-se a incorporação de vermelho neutro nas vesículas secretoras (FIGURA 11). Os pacientes sem suplementação tiveram redução de, aproximadamente, 1,5 vezes em relação aos pacientes no início da suplementação e aos pacientes suplementados. Já os com suplementação, a captação de vermelho neutro está em concordância com os da atividade fagocitária, pois demonstram que além dos neutrófilos dos indivíduos suplementados terem maior atividade fagocitária também, conseguem processar o material englobado. Este fato talvez possa ser explicado pela capacidade dos AGPI modificarem a estrutura da membrana do complexo golgiense e assim alterar a fase de separação entre esfingolipídios e colesterol em que regiões ricas em AGPI podem alterar a produção das vesículas de secreção ou alterar seu transporte para a membrana plasmática (SHAIKH & EDIDIN, 2008).

O fagossomo representa um espaço protegido que compartimentaliza ambos, o micróbio e o fagócito, dos produtos citotóxicos que podem causar injúrias a este (MORAES, 2003). Após a formação do fagossomos ocorre à produção das ROS, que são essenciais para a morte do patógeno e iniciação da morte celular programada, apoptose (SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2008). De acordo com estimativas, cerca de 1% do oxigênio absorvido pelos tecidos de mamíferos é convertido em espécies reativas do oxigênio, entre elas temos o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). (MANTOVANI *et al.*, 2008). Mudanças no redox celular são mais exploradas na cardiologia do que na oncologia. Porém, esses eventos são fundamentais na carcinogênese. Inicialmente os radicais livres originados do estresse oxidativo, promovem danos ao DNA celular, então mudanças no redox celular podem ser usadas nas terapias usadas no tratamento do câncer.

O redox celular pode ser entendido basicamente como redução e oxidação de átomos, moléculas ou íons. Ou seja, ocorre transferência de elétrons, sendo que o evento mais marcante desse processo é a formação das ROS (FREIN, *et al.*, 2005). Por anos assumiu-se que os radicais livres eram prejudiciais para as células. Em baixas concentrações eles protegem as células, em altas concentrações eles podem danificar

muitas moléculas biológicas, como o DNA, proteínas e lipídios (RIGAS & SUN, 2008). Já está bem estabelecido que neutrófilos sintetizam e liberam radical superóxido pela ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase em resposta a uma grande quantidade de estímulos através de mecanismos diferentes por sinais de transdução (VÁSQUEZ, *et al.*, 2004).

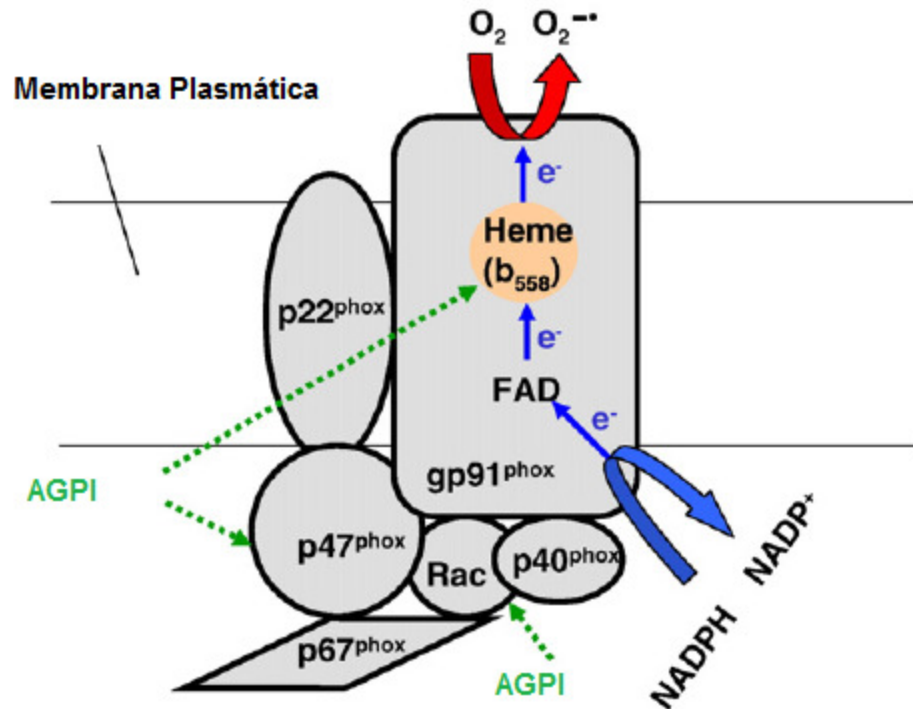


FIGURA 29: Complexo NADPH oxidase com sítios de interação com os AGPI. A abreviatura *phox* é usada como padrão para a enzima oxidase fagocítica. Adaptado de SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2008.

A NADPH oxidase, em neutrófilos, corresponde a um complexo enzimático, composta por duas subunidades de membrana, p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup>, e três componentes citossólicos, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>. Sendo que as subunidades da membrana constituem uma flavo-heme proteína denominada de citocromo b558 (FIGURA 29). Quando o neutrófilo é estimulado ocorre a fosforilação dos resíduos de serina ou treonina da p47<sup>phox</sup> que então migram para a membrana e se associam com o citocromo b558. A enzima então transfere elétrons do seu substrato, o NADPH, para o oxigênio utilizando os grupamentos carreadores de elétrons a flavina e o grupo heme

(CURI *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2007). A NADPH oxidase pode ser ativada por mecanismos dependentes e independentes de receptor. Entre os agentes independente de receptor temos os AGPI como o oléico e araquidônico (LEAVER *et al.*, 1996; SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2008).

As mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana têm grande importância porque essas alterações da membrana alteram, por exemplo, a sua fluidez podendo levar a alterações na produção de ROS (TEITELBAUM & WALKER, 2001). O perfil lipídico dos neutrófilos dos pacientes suplementados (FIGURA 14) estava incrementado em EPA e DHA em aproximadamente 1,5 vezes e também ocorreu redução da concentração de AA de 1,2 vezes. Demonstrando assim, que houve incorporação de AGPI n-3 na membrana. PANCHAUD *et al.*, 2006, também demonstraram a incorporação de EPA e DHA em neutrófilos. Resultados semelhantes, também, foram encontrados por CLEANLAND *et al.*, 1992, quando indivíduos saudáveis receberam suplementação de 1,6 g/dia de EPA e 0,32 g/dia de DHA, durante 4 semanas. Os AGPI têm demonstrado serem capazes de levar a maior produção do ânion superóxido, em neutrófilos humanos, e induzir a mudanças morfológicas, como as evaginações, que podem facilitar a maior produção de vesículas endocíticas e o processo de fagocitose (VÁSQUEZ, *et al.*, 2004). Esta afirmação é corroborada por nosso estudo, pois os indivíduos suplementados com óleo de peixe aumentaram em 1,3 vezes a produção de  $O_2^-$  (FIGURA 12) em relação ao início da suplementação. Estudos de CHEN *et al.*, 1994, demonstraram redução da produção de ânion superóxido por células polimorfonucleadas (PMN) de pessoas saudáveis tratadas com EPA e DHA *in vitro*. Já MAYER, *et al.*, 2003, demonstraram aumento na produção de ROS em pacientes que receberam suplementação com AGPI n-3. LI *et al.*, 1996, num estudo *in vitro*, encontraram aumento da produção de ânion superóxido quando trataram neutrófilos humanos, por 30 minutos, com Fator de Necrose Tumoral-TNF (100 U) e EPA (10µg/mL) ou DHA, na mesma concentração. Estas diferenças provavelmente são devidas aos diferentes protocolos experimentais. Quando um ânion superóxido reage com outro temos a formação de uma substância estável, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este foi reduzido em aproximadamente 1,4 vezes nos indivíduos sem suplementação ao final de 8 semanas, quando comparados com a produção obtida no

início do tratamento quimioterápico. Já os neutrófilos dos indivíduos suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe, não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) em relação ao início da suplementação. CALDER, 2001, relatou que a ingestão de 0,27 a 2,25 g/dia de EPA e DHA não altera a produção de ROS. Mas em alguns estudos, da década de 1990, foi mostrado que a ingestão diária de EPA (3,4 g) e DHA (8,6 g) diminui a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos e monócitos (FISHER *et al.*, 1990; THOMPSON, *et al.*, 1991; LUOSTARINEN, *et al.*, 1992). Estes diferentes achados, controversos, podem ser explicados devido aos diferentes protocolos experimentais utilizados.

De maneira geral, os neutrófilos obtidos dos indivíduos suplementados com óleo de peixe mantiveram perfil funcional similar ao observado no início da suplementação e em alguns casos foi observado incremento da resposta. A inflamação desempenha papel central na defesa do organismo contra patógenos, contudo caso ela não seja ordenada e extinta no tempo certo, pode se tornar crônica e contribuir para doenças como a artrite, doenças cardíacas, Alzheimer, entre outras (BALKWILL & COUSSENS, 2004). KOCH & HELLER, 2005, descreveram efeitos benéficos do óleo de peixe em peritonite e sépsis abdominal. Eles realizaram a suplementação, por cinco dias, com óleo de peixe via parenteral, e observaram que as concentrações de CRP (proteína C reativa - indicador de reação inflamatória) foram menores no grupo suplementado. Também foi relatado que aos pacientes foi administrado menor doses de antibióticos, permaneceram menos dias no hospital e tiveram menor necessidade de novas cirurgias. Em pacientes com câncer de cólon, suplementados via parenteral com emulsão de óleo de peixe (0,2 g/kg de peso corporal de AGPI n-3), pós cirurgia de ressecção, durante 7 dias, foi relatado redução da resposta inflamatória, o que foi benéfico ao paciente (LIANG *et al.*, 2008).

Ingestão de dietas ricas em AGPI n-3 diminuiu a mortalidade por doenças cardiovasculares (SURRETE, 2004). Isto tem sido atribuído a melhora endotelial, a redução da resposta inflamatória e triacilglicerolemia (STARK, 2008). A redução dos triacilgliceróis pode ser explicada pela competição entre os AGPI n-3 pela posição sn-2 dos fosfolipídios (STARK, 2008). A molécula de triacilglicerol (TAG) é formada por uma molécula de glicerol com três ácidos graxos ligados ao glicerol. As concentrações

plasmáticas de triacilgliceróis (FIGURA 20) no nosso estudo, não apresentaram diferença significativa quando comparamos os indivíduos suplementados com 2 g/dia de óleo peixe em relação ao início da suplementação. Porém, nos indivíduos sem suplementação houve aumento de 1,3 vezes na concentração de TAG em relação ao grupo suplementado. MOORE *et al.*, 2006 relataram redução de 6,7% nos TAG em pessoas com sobrepeso que ingeriram duas porções de peixe (salmão, truta ou cavala) durante 3 meses. Dados mais expressivos foram obtidos por SCHIANO *et al.*, 2008, que mostraram a redução de aproximadamente 37% dos triacilgliceróis no plasma de pacientes com doenças cardiovasculares que ingeriram 2 g/dia de óleo de peixe durante 3 meses. Porém, este grupo não encontrou modificação no perfil plasmático de lipoproteínas de alta densidade (HDL *high density lipoprotein*) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL *low density lipoprotein*). Já no nosso estudo houve incremento da HDL, nos indivíduos suplementados, de 1,3 vezes em relação aos demais indivíduos estudados (FIGURA 21). Trabalhos de HARRIS, 1999; STERH & HELLER, 2006; MOORE *et al.*, 2006; NAGAO & YANAGITA, 2008, também observaram aumento das concentrações de HDL em pacientes que recebem de 3 a 4 g/dia de óleo de peixe e este efeito foi atribuído ao aumento da lipólise e decréscimo da lipogênese, principalmente no fígado.

O processo de digestão dos lipídios é muito complexo, tendo início no estômago, passando pelo intestino delgado, onde ocorre a digestão completa e a absorção (CURI *et al.*, 2002). O colesterol é absorvido nos enterócitos do intestino delgado e é transformado de triacilgliceróis para quilomícrons, os quais são transportados até o fígado, onde são secretados pela lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL *very low density lipoprotein*), as quais são processadas e transformadas em lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual é a principal proteína transportadora de colesterol para os tecidos (IKONEN, 2008). Em nosso estudo as concentrações plasmáticas de LDL se mantiveram constantes nos pacientes suplementados em relação ao início da suplementação, mas foram aumentadas em 1,3 vezes nos pacientes que não receberam suplementação (FIGURA 22). Resultados semelhantes foram encontrados nas concentrações plasmáticas de VLDL, as quais foram aumentadas em 1,4 vezes, nos pacientes não suplementados em relação aos

suplementados (FIGURA 23). LU, *et al.*, 1999, mostraram redução de triacilgliceróis e VLDL colesterol. Relataram ainda que indivíduos suplementados com óleo de peixe (5 g/dia) produziram menos triacilgliceróis e VLDL-colesterol. Estes resultados talvez possam ser explicados porque maior parte dos triacilgliceróis é transportada no plasma pelas VLDL (HODSON *et al.*, 2008) e nesse caso, parece que a redução da substância a ser transportada também inibiu o transportador (VLDL).

Quando os tecidos extra-hepáticos possuem excesso de colesterol ocorre um processo chamado transporte de colesterol reverso. Nesse transporte a lipoproteína de alta densidade (HDL) leva o colesterol para o fígado. Deste, o colesterol é secretado pela bile, como sais biliares ou como colesterol mesmo (HODSON *et al.*, 2008). As principais fontes de colesterol são: a síntese de novo (~70%) e a dieta (~30%) (IKONEN, 2008). A colesterolemia total dos pacientes suplementados não foi alterada em relação ao início da suplementação, mas os indivíduos não suplementados tiveram incremento de 1,2 vezes na concentração plasmática de colesterol (FIGURA 19). SCHIANO *et al.*, 2008, relataram redução de 1,2 vezes nas concentrações de colesterol total, em pacientes com doenças cardiovasculares que receberam 2 g/dia de óleo de peixe, por 3 meses. Estes resultados conflitantes podem ser explicados por diferenças em protocolos e, pelo fato de que estudos para mensurar lipídios são difíceis de conduzir. Isto porque as concentrações plasmáticas de lipídios são afetadas por vários fatores, como: tipo de dieta; uso de suplementos; polimorfismos genéticos de alongases e saturases; armazenamento da amostra; lipogênese; oxidação; estado nutricional de Fe, Zn e Mg, mudanças recentes na dieta, o hábito de fumar e atividades físicas além, de quimioterápicos anticâncer (ARAB, 2003; HODSON *et al.*, 2008).

Os mamíferos possuem dois mecanismos de controle do metabolismo, um atua de forma rápida e curta e outro que atua de forma lenta e longa. O controle rápido é conseguido com alterações de enzimas (ativação/desativação) ou por alterações da estabilidade de proteínas. Mais eficiente é o controle lento e de longa duração (horas ou dias) e, é a regulação transcricional. Realizada por dois tipos de receptores: ligantes hidrofílicos (diazepinas), ligando-se em receptores de superfície, ativando cascatas de segundos mensageiros que transmitem sinais para transcrição de fatores que controlam a expressão de genes; e ligantes hidrofóbicos (ácidos graxos, ácido retinóico, vitaminas



e hormônios) entram na célula e são transportados para o núcleo interagindo com receptores intracelulares e nucleares que servem como receptores de nutrientes. Estes ligantes hidrofóbicos atuam como moduladores de fatores de transcrição exercendo função regulatória diretamente nos genes. Receptores nucleares como os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos (PPAR), fator nuclear de hepatócito 4  $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), receptor da tireóide (T3R), receptores de glicocorticóides (GR), receptor X do fígado (LXR), e receptor X do ácido retinóico (RXR) e outros regulam a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e carboidratos (DESVERGNE *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2008). Dietas ricas em gordura aumentam a expressão de genes ativados pelo PPAR- $\alpha$ , principalmente de proteínas ligantes de ácidos graxos do fígado e enzimas  $\beta$ -oxidativas. Os PPARs (*Peroxisome proliferator-activated receptors*) são ligantes ativadores de receptores nucleares relacionados com a modulação de estímulos ambientais e da dieta. Eles se ligam a elementos responsivos-PPRE, e atuam em genes como o PPAR/receptor retinóide X. Possuem 3 isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ . SPRECHER *et al.*, 2007, demonstraram que agonista de PPAR $\beta/\delta$ , influenciou significativamente as concentrações plasmáticas de HDL-colesterol e triacilgliceróis, em voluntários saudáveis. A ativação do HNF4 $\alpha$ , efetuada por ácidos graxos saturados aumenta as concentrações plasmáticas de lipídios ricos em lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) e seus constituintes apolipoproteínas, enquanto que a dieta rica em AGPI diminui as concentrações de lipoproteínas e apolipoproteínas séricas. Estes AGPI podem regular a concentração de lipoproteínas pela modulação do HNF4- $\alpha$ , que transcreve genes que codificam apolipoproteínas, AI, AII, B e CIII (HAYHURST *et al.*, 2001). O perfil lipídico plasmático dos pacientes suplementados com óleo de peixe (FIGURA 16) mostrou aumento dos AGPI n-3, EPA e DHA de aproximadamente 3 vezes, após 8 semanas de suplementação, com redução do AA de aproximadamente 2 vezes. Dados semelhantes foram descritos por ANDRADE, *et al.*, 2007, que também observaram aumento das concentrações plasmáticas em nadadores de elite, na fase de pré-competição, que foram suplementados com 2,5 g/dia com óleo de peixe, durante 6 semanas. Nos indivíduos que não receberam suplementação as concentrações plasmáticas de EPA, DHA e AA se mantiveram constantes durante as oito semanas (FIGURA 18).

Os ácidos graxos têm múltiplos papéis na estrutura e na função celular. Eles podem ser esterificados em fosfolipídios, sendo fonte de energia e armazenado na forma de triacilglicerol (TAG); serem incorporados na membrana; funcionarem como moléculas sinalizadoras na forma de diacilglicerol (DAG) ou podem ser oxidados para a produção de ATP. A composição de fosfolipídios é geralmente característica de cada tipo celular, mas pode variar conforme a idade, o ciclo celular, em respostas a estímulos, devido a alterações no ambiente ou na composição da dieta (GORJÃO *et al.*, 2006). Estas alterações podem resultar em modificações nas funções celulares sendo que estudos epidemiológicos indicam que o consumo elevado de gorduras saturadas pode levar ao aumento da incidência de tumores malignos de mama e cólon. Já dietas ricas em AGPI n-3 podem reduzir esse risco (STERH & HELLER, 2006).

O câncer é caracterizado por inúmeras alterações genômicas e/ou epigenômicas que se acumulam nas células e, de alterações que podem modificar o estroma celular criando um microambiente favorável à proliferação celular (CHIN & GRAY, 2008). ZITVOGEL *et al.*, 2006 descreveram sete fenômenos que determinam o câncer: as células de tumores malignos possuem auto-suficiência na produção de fatores de crescimento; ignoram sinais inibitórios de crescimento; evitam a morte celular; tem replicação sem limites; sustentam a angiogênese; invadem tecidos vizinhos, fazendo um fenômeno denominado metástase e, conseguem escapar da vigilância do sistema imunitário.

A importância dos AGPI, nos processos carcinogênicos, foi confirmada por relatos que mostraram que as células tumorais têm mudanças nas suas composições lipídicas que favorecem sua proliferação (TROMBETTA *et al.*, 2007). A primeira associação entre câncer e lipídios foi feita há mais de 25 anos e, a proteína C quinase (PKC) foi associada a esse fenômeno. Este fato foi em decorrência da PKC ser ativada por um lipídio, diacilglicerol (DAG) na presença da fosfatilserina como co-fator (GRINER & KAZANIETZ, 2007). Receptores associados à proteína G compreendem uma grande família de receptores da membrana celular que regulam inúmeras funções, incluindo proliferação celular, sobrevivência, motilidade, crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Células malignas podem modificar as funções dos receptores associados a proteínas G e levar a proliferação de maneira autônoma; podem dificultar a

imunovigilância, aumentar o aporte de nutrientes e oxigênio, invadir os tecidos adjacentes ou disseminar-se para outros órgãos (DORMAM & GUTKIND, 2007).

As terapias usadas no tratamento do câncer podem causar, geralmente, injúrias à medula óssea, podendo levar a neutropenia. Isto leva a uma redução nas doses dos quimioterápicos ou na radioterapia e, na maior vulnerabilidade dos pacientes a infecções (KAWAGISHI, *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que a neutropenia persistente é um dos fatores que contribuem para o aparecimento de infecções, hospitalização e mortalidade em pacientes com câncer (CRIGHTON & PUPPIONE, 2006). WONG *et al.*, 2001, advogam que a dieta do paciente deve ser considerada, pois a má-nutrição contribui para a maior morbidade e mortalidade. Sendo assim, deve-se fazer uso de suplementos alimentares nesses indivíduos. Pacientes que receberam suplementação com 2g/dia de óleo de peixe, não apresentaram neutropenia (FIGURA 25), porém, os indivíduos que não receberam suplementação tiveram redução de 1,6 vezes em relação ao início do tratamento quimioterápico. A habilidade de um tumor invadir e se metastisar depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Ou seja, de características das células tumorais e do meio onde ele está inserido. O fenótipo anormal de um tumor pode estimular o influxo de leucócitos inflamatórios nos tecidos vizinhos e estabelecer um quadro de destruição dos tecidos vizinhos (WASH *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2008). Também se verifica neutrofilia acompanhada de linfopenia, nos quadros tumorais. No nosso estudo os pacientes não apresentaram linfopenia, em relação ao início do tratamento quimioterápico (FIGURA 26).

Outro aspecto importante nos pacientes portadores de câncer é a síndrome da caquexia, caracterizada por um catabolismo exacerbado. Esta síndrome ocorre entre 30-85% dos pacientes e contribui para a morbidade e mortalidade nos pacientes com neoplasias em estagio avançado (FEARON, *et al.*, 2003). Dentre seus mediadores temos interleucinas, TNF, e hormônios, além de alterações no paladar que dificultam a ingestão de alimentos (ARGILÉS, 2005). Os pacientes com câncer podem sofrer, freqüentemente, com obstruções físicas no sistema digestório, dores, depressão, constipação, debilidade, má absorção dos nutrientes e os efeitos dos tratamentos com radioterapia e/ou quimioterapia podem também diminuir a ingestão de alimentos (BARBER, *et al.*, 1999). Estudos sugerem que o uso de AGPI n-3 tem papel nutricional

e funciona como suporte nutricional em pacientes com câncer, pois permite estabilizar a perda de peso e em alguns casos o paciente pode até ganhar peso (BERQUIN *et al.*, 2008). FEARON, *et al.*, 2006 mostraram aumento da sobrevida (aproximadamente 1,5 vezes) e do peso (cerca de 1 kg) de pacientes com câncer gástrico e de pulmão que foram suplementados por 4 ou 8 semanas com 2 g de EPA, em relação ao grupo que recebeu placebo. Pacientes sofrendo de caquexia de câncer decorrente do câncer de pâncreas perdiam em média 2,9 kg mês. Ao serem suplementados com 1,1 g/dia de EPA obtiveram reversão desse quadro caquético e após sete semanas apresentaram ganho de peso, em média 2 kg (STEHR & HELLER, 2006). Neste estudo a suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe foi eficiente em aumentar o peso em 63% dos pacientes, como já descrito anteriormente (FIGURA 9).

Outro parâmetro para se avaliar recuperação da caquexia é a lactatemia (FIGURA 24). Mesmo após remoção do tumor, pacientes não suplementados apresentaram lactatemia elevada. Por outro lado, pacientes suplementados com óleo de peixe apresentaram redução da concentração do lactato circulante de 1,2 vezes. Uma possível explicação para este fato é de que ácido eicosapentaenóico (EPA) tem mostrado propriedades antiinflamatórias, incluindo a modulação de citocinas em humano e, também em animais. A atividade do EPA neste contexto tem sido descrita como inibidor das vias do sistema ubiquitina/proteossoma, por inibir o fator indutor de proteólise (FEARON, *et al.*, 2006; LIANG, *et al.*, 2008). Uma segunda hipótese é de as células tumorais catabolizam glicose acima de suas necessidades bioenergéticas. Nesse cenário as células tumorais redirecionam o excesso de piruvato para a *síntese de novo* de lipídios (FASN) (WYMAN & SCHNEITER, 2008). O qual é usado para manter o constante uso de lipídios na construção de novas membranas celulares e modificar proteínas (acilação). Esses lipídios são esterificados em fosfolipídios e incorporados as membranas (MEER *et al.*, 2008). Esta exacerbada lipogênese é evidenciada nas células tumorais pelo aumento da atividade e expressão de enzimas lipogênicas (acetil CoA, ATP citrato liase – ACLY, CoA carboxilase- ACACA). O aumento de FASN leva a produção do ácido graxo saturado palmitato, pela condensação de acetil CoA em malonil CoA (HANNUN & OBEID, 2008). Porém, esta

hipótese não se aplica neste estudo, pois os pacientes já haviam feito remoção cirúrgica dos tumores.

## 5. RESULTADOS REFERENTES AOS PARÂMETROS *IN VITRO*

O perfil de ácidos graxos (%) presentes no complexado à albumina está apresentado na TABELA 8. A concentração de EPA e DHA foi encontrada em maior quantidade 17,1 e 12,9%, respectivamente. O total de ácidos graxos saturados correspondeu a 36,4% e o de 59,4 representou o de ácidos graxos poliinsaturados. Da família ômega-3, encontramos 31,8%; de ômega-6 foi de 2,3%; de ômega-7 foi de 4,1% e ômega-9 foi de 10,5%. A análise do perfil lipídico do complexado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 4 amostras.

TABELA 8: Composição de ácidos graxos do complexado (óleo de peixe + albumina sérica bovina) utilizado nos experimentos *in vitro*. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 4 amostras.

| Ácido graxo             | Complexado (%) |
|-------------------------|----------------|
| Láurico (12:0)          | 1,5 $\pm$ 0,5  |
| Mirístico (14:0)        | 11,7 $\pm$ 1,0 |
| Palmítico(16:0)         | 21,3 $\pm$ 0,4 |
| Esteárico (18:0)        | 1,9 $\pm$ 0,6  |
| Palmitoléico (16:1 n-7) | 4,1 $\pm$ 0,7  |
| Oléico (18:1 n-9)       | 10,5 $\pm$ 1,0 |
| Linoléico (18:2 n-6)    | 2,3 $\pm$ 0,8  |
| Linolênico(18:3 n-3)    | 1,8 $\pm$ 0,8  |
| EPA (22:5 n-3)          | 17,1 $\pm$ 0,4 |
| DHA (22:6 n-3)          | 12,9 $\pm$ 0,6 |

Na TABELA 9 estão apresentadas as percentagens de ácido eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) encontradas nos tumores de cólon e reto após incubação com o complexado albumina-óleo de peixe. Nos tumores incubados nas condições controle (meio de cultura + soro fetal bovino) a concentração (%) de EPA foi de 1,3, de DHA 0,22 e AA foi de 0,34. Nas mesmas condições com a presença de albumina sérica (BSA) EPA foi de 1,2, DHA 0,2 e AA de 0,32, as quais não foram diferentes das encontradas no grupo controle. Na presença do complexado diluído 1:5 houve incremento nas concentrações de EPA para 1,7 e de DHA para 0,48 ambos significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos dois prévios grupos. Quanto ao AA, este reduziu de aproximadamente 2 vezes em comparação à dos referidos grupos ( $p < 0,05$ ). Na diluição 1:10 a concentração de EPA não foi diferente da situação controle ou BSA ( $p > 0,05$ ). Entretanto, DHA continuou 2,1 vezes maior que à do controle e BSA ( $p < 0,05$ ) e, à de ácido araquidônico 1,4 vezes menor que à do controle e BSA ( $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos realizados em duplicatas.

TABELA 9: Porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) em cultura de tumores colorretais. Cultivados durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C), meio de cultura com BSA 2% (BSA) e meio de cultura com óleo de peixe e BSA complexados nas proporções 1:5 e 1:10.

|          | EPA(%)          | DHA(%)           | ARAQUIDÔNICO (%) |
|----------|-----------------|------------------|------------------|
| Controle | 1,3 $\pm$ 0,04  | 0,22 $\pm$ 0,06  | 0,34 $\pm$ 0,04  |
| BSA      | 1,2 $\pm$ 0,04  | 0,20 $\pm$ 0,09  | 0,32 $\pm$ 0,14  |
| 1:5      | 1,7 $\pm$ 0,06* | 0,48 $\pm$ 0,18* | 0,17 $\pm$ 0,01* |
| 1:10     | 1,5 $\pm$ 0,08  | 0,47 $\pm$ 0,08* | 0,24 $\pm$ 0,03* |

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Na TABELA 10 estão apresentadas as percentagens de ácido eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) encontradas nos tumores de mama após incubação com o complexado albumina-óleo de peixe. Nos tumores incubados nas condições controle (meio de cultura + soro fetal bovino) a concentração (%) de EPA foi de 1,1; de DHA 0,33 e AA foi de 0,33. Nas mesmas condições com a presença de albumina sérica (BSA) EPA foi de 1,2, DHA 0,34 e AA de 0,34, as quais não foram diferentes das encontradas no grupo controle. Na presença do complexado diluído 1:5 houve incremento nas concentrações de EPA para 1,8 e de DHA para 0,47 ambos significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos dois prévios grupos. Quanto ao AA, este reduziu de aproximadamente 2,5 vezes em comparação à dos referidos grupos ( $p < 0,05$ ). Na diluição 1:10, a concentração de EPA foi de 1,4 e DHA 0,43, que representou aumento de 1,3 vezes quando comparados aos grupos controle ou BSA ( $p < 0,05$ ). Ácido araquidônico, nesta diluição atingiu os valores de BSA e controle ( $p > 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos realizados em duplicatas.

TABELA 10: Porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) em cultura de tumores de mama. Cultivados durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (Controle), meio de cultura com BSA 2% (BSA) e meio de cultura com óleo de peixe e BSA complexados nas proporções 1:5 e 1:10.

|          | EPA(%)          | DHA(%)           | ARAQUIDÔNICO (%) |
|----------|-----------------|------------------|------------------|
| Controle | 1,1 $\pm$ 0,04  | 0,33 $\pm$ 0,02  | 0,33 $\pm$ 0,02  |
| BSA      | 1,2 $\pm$ 0,04  | 0,34 $\pm$ 0,02  | 0,34 $\pm$ 0,01  |
| 1:5      | 1,8 $\pm$ 0,06* | 0,47 $\pm$ 0,01* | 0,13 $\pm$ 0,01* |
| 1:10     | 1,4 $\pm$ 0,06* | 0,43 $\pm$ 0,02* | 0,28 $\pm$ 0,02  |

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.



A FIGURA 30 mostra a proliferação tumoral, em contagem por minuto (CPM), de câncer de cólon e reto. A proliferação das células quando da adição de BSA não foi diferente da observada no grupo controle. Por outro lado, a adição do complexo albumina-óleo de peixe na diluição 1:5, induziu a uma redução da proliferação das células em 1,8 vezes e em 1,2 vezes na diluição 1:10 em comparação à do grupo controle ( $p < 0,05$ ). A adição do óleo de peixe complexado a albumina nas diluições 1:20 e 1:50 não promoveram nenhum efeito, sendo a proliferação similar à do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

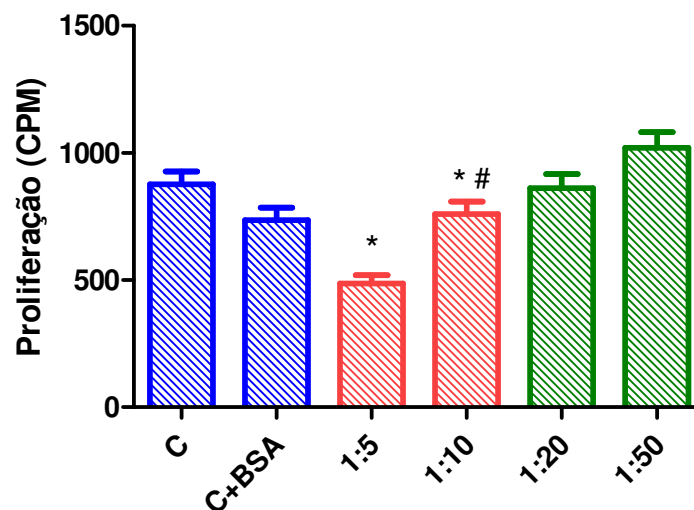


FIGURA 30: Proliferação de células tumorais de cólon e reto, mensurada através da incorporação de (2-14C) timidina em DNA. Culturas de 24 h em meio RPMI 1640 com soro fetal bovino a 10% e antibióticos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 17 ressecções, sendo que cada experimento foi realizado em hexaplicata.

\* $p < 0,05$  quando comparado a todos os demais grupos;

# $p < 0,05$  quando comparado ao grupo 1:5

A proliferação tumoral, em contagem por minuto (CPM), de células obtidas de câncer de cólon e reto está apresentada na FIGURA 31. A proliferação das células quando da adição de BSA não foi diferente da observada no grupo controle. Por outro lado, a adição do complexado albumina-óleo de peixe na diluição 1:5, induziu a uma redução da proliferação das células em 2,2 vezes e em 1,3 vezes na diluição 1:10 em comparação à do grupo controle ( $p < 0,05$ ). A adição do óleo de peixe complexado a albumina nas diluições 1:20 e 1:50 não promoveram nenhum efeito, sendo a proliferação similar à do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

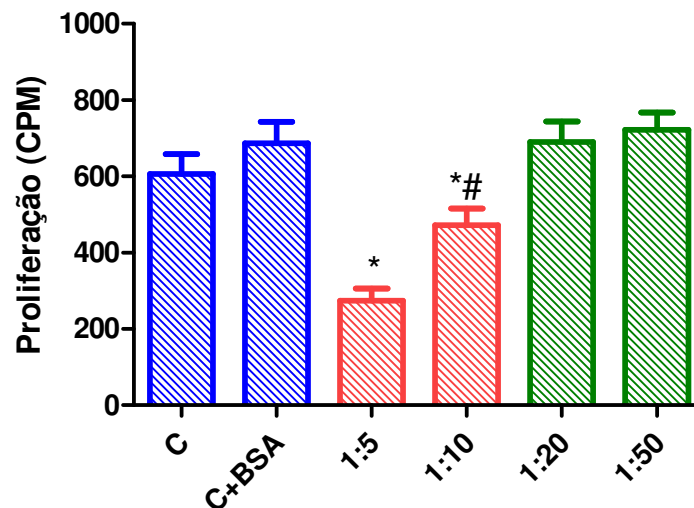


FIGURA 31: Proliferação de células tumorais de mama, mensurada através da incorporação de ( $2\text{-}^{14}\text{C}$ ) timidina em DNA. Culturas de 24 h em meio RPMI 1640 com soro fetal bovino a 10% e antibióticos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 17 ressecções, sendo que cada experimento foi realizado em hexaplicata

\* $p < 0,001$  quando comparado a todos os demais grupos;

# $p < 0,05$  quando comparado ao grupo 1:5

Na FIGURA 32 estão apresentados, em número de eventos, os dados referentes a apoptose das células obtidas de melanoma, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). Já a adição do óleo de peixe-BSA complexados 1:5 no meio de cultura elevou a taxa de apoptose em 2,6 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

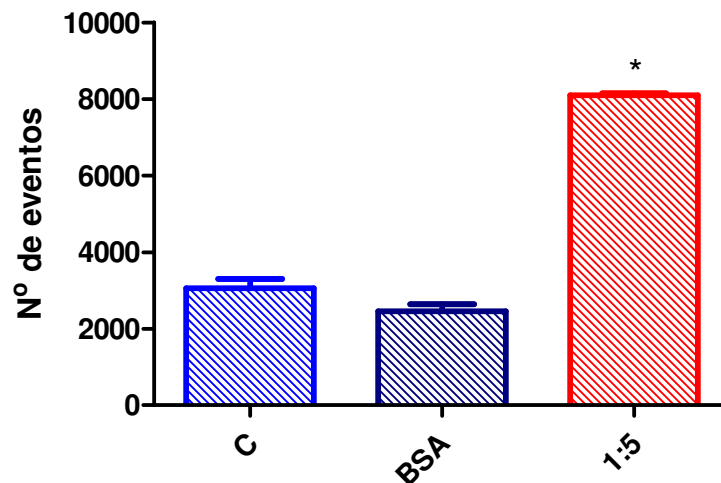


FIGURA 32: Apoptose das células tumorais obtidas de melanoma, cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Na FIGURA 33 estão apresentados, em número de eventos, os dados referentes a apoptose das células obtidas de tumor de colon e reto, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). Já a adição do óleo de peixe-BSA complexados 1:5 no meio de cultura elevou a taxa de apoptose em 1,6 vezes, a qual foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ) quando comparada à dos grupos C e BSA.

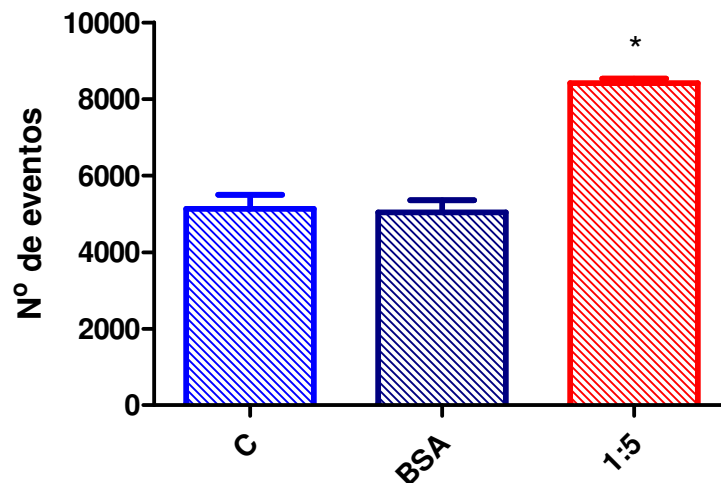


FIGURA 33: Apoptose das células tumorais obtidas de tumores de colon e reto, cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Na FIGURA 34 estão apresentados, em número de eventos, os dados referentes a apoptose das células obtidas de tumor de mama, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). Já a adição do óleo de peixe-BSA complexados 1:5 no meio de cultura elevou a taxa de apoptose em 2 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

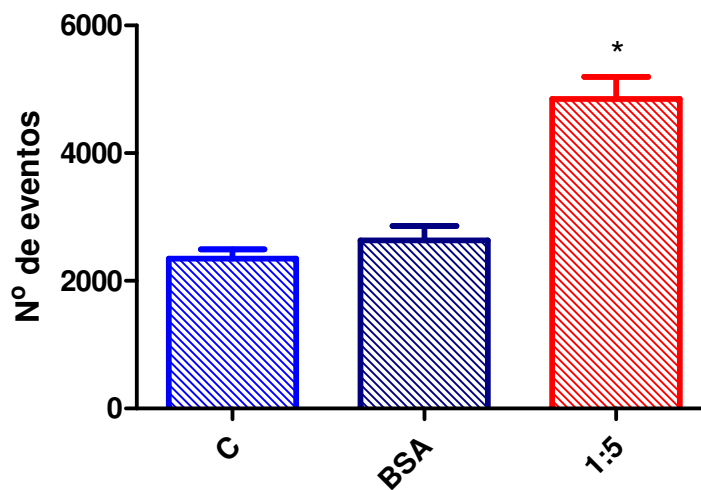


FIGURA 34: Apoptose das células tumorais de mama cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C), meio de cultura com BSA 2% (BSA) e meio de cultura com óleo de peixe e BSA complexado (1:5). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Na FIGURA 35 estão representados, em número de eventos, os dados referentes à necrose das células obtidas de melanoma, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). Porém na presença do óleo de peixe-BSA complexados diluído 1:5 a necrose foi reduzida em 2 vezes, a qual foi significativamente menor quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

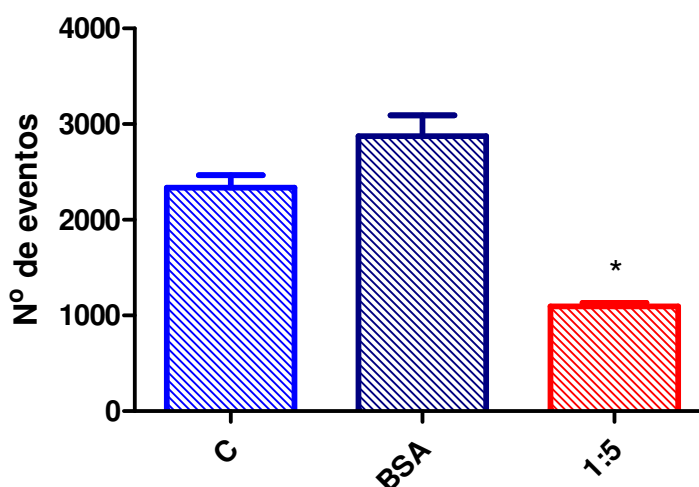


FIGURA 35: Necrose das células tumorais de melanoma cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Na FIGURA 36 estão representados, em número de eventos, os dados referentes a necrose das células obtidas de tumores colorretais, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). Já a adição no meio de cultivo do óleo de peixe-BSA complexados diluídos 1:5 promoveu redução necrose em 6,2 vezes, a qual foi significativamente menor quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

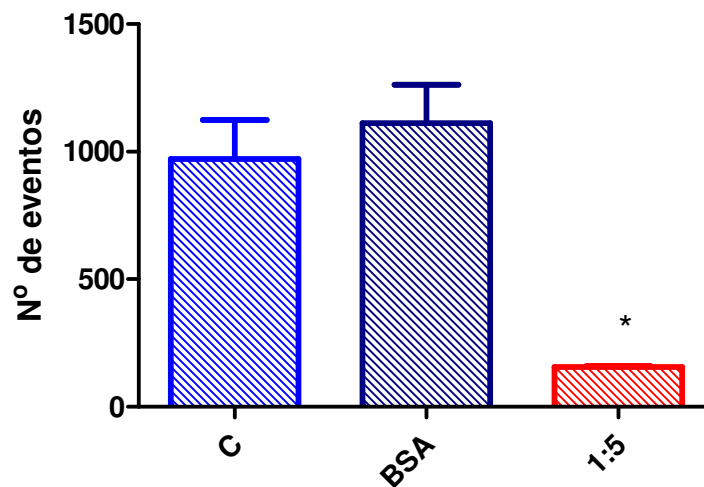


FIGURA 36: Necrose das células tumorais colorretais cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Na FIGURA 37 estão apresentados, em número de eventos, os dados referentes à necrose das células obtidas de tumor de mama, após cultivo em meio de cultura (C), após a adição de BSA 2% (BSA) e após a adição de óleo de peixe e BSA-complexados na diluição 1:5. A adição de BSA não promoveu nenhum efeito sobre estas células quando comparadas à do controle ( $p > 0,05$ ). A adição do óleo de peixe-BSA complexados diluídos 1:5, a necrose foi reduzida em 5 vezes, a qual foi significativamente menor quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

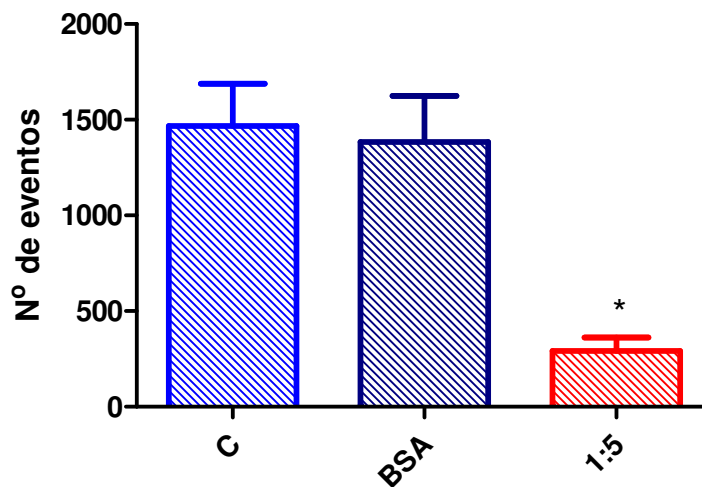


FIGURA 37: Necrose das células de tumor de mama cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.



Os dados apresentados na FIGURA 38 são referentes à peroxidação lipídica (nmol de hidroperóxido/mg de proteína) de células tumorais obtidas do estômago, cultivadas em meio de cultura (C) e adicionadas com BSA 2% (BSA) ou óleo de peixe-BSA complexados diluído 1:5. A peroxidação lipídica nestes tumores não foi diferente entre os grupos controle (C) e BSA ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, o cultivo na presença do óleo de peixe-BSA complexados diluído 1:5, induziu elevação na taxa de peroxidação lipídica em 3,3 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

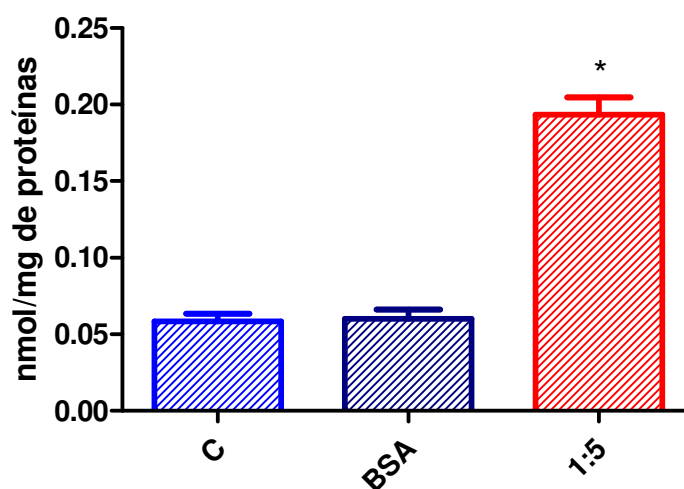


FIGURA 38: Peroxidação lipídica das células tumorais obtidas de estômago, cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 experimentos em triplicata

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Os dados apresentados na FIGURA 39 são referentes à peroxidação lipídica (nmol de hidroperóxido/mg de proteína) de células tumorais colorretais, cultivadas em meio de cultura (C) e adicionadas com BSA 2% (BSA) ou óleo de peixe-BSA complexados diluído 1:5. A peroxidação lipídica nestes tumores não foi diferente entre os grupos controle (C) e BSA ( $p > 0,05$ ). Já o cultivo na presença do óleo de peixe-BSA complexados diluído 1:5, induziu elevação na taxa de peroxidação lipídica em 6,7 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

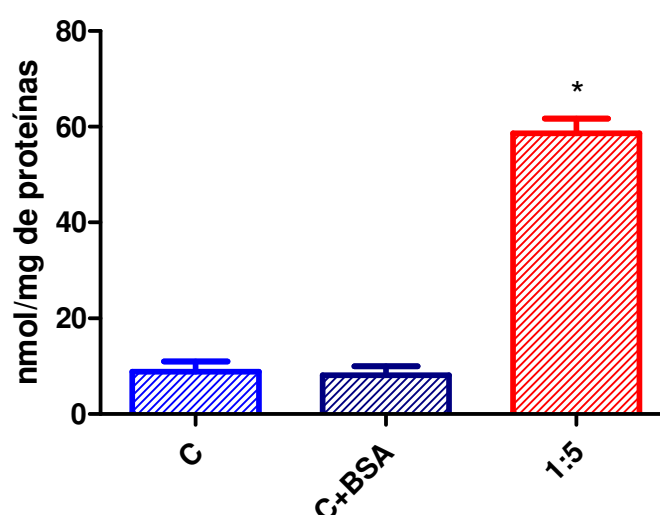


FIGURA 39: Taxa de peroxidação lipídica das células tumorais colorretais cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C), meio de cultura com BSA 2% (BSA) e meio de cultura com óleo de peixe-BSA complexado (1:5). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM de 6 experimentos realizados em triplicatas.

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

Os dados apresentados na FIGURA 40 são referentes à taxa de peroxidação lipídica (nmol de hidroperóxido/mg de proteína) das células tumorais (mama) cultivadas na presença de meio de cultura (C), de BSA 2% (BSA) e na de óleo de peixe e BSA complexado (1:5). Os grupos controle (C) e BSA não apresentaram diferença significativa entre si quanto à taxa de peroxidação lipídica ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, na presença do óleo de peixe e BSA complexado (1:5) a taxa de peroxidação lipídica foi elevada em 8,6 vezes, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos grupos C e BSA ( $p < 0,001$ ).

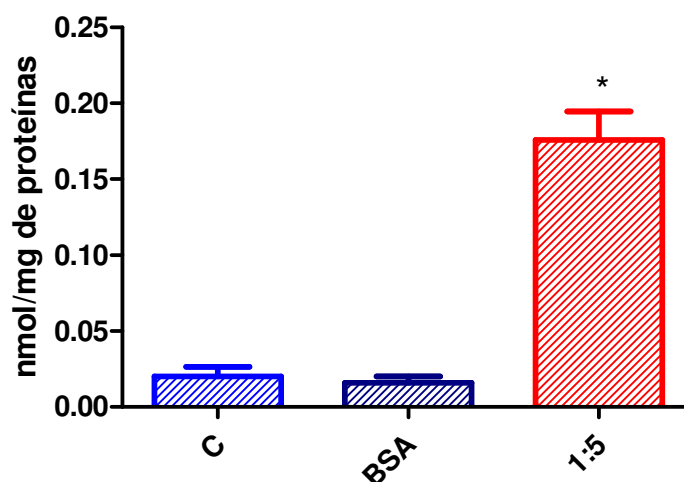


FIGURA 40: Peroxidação lipídica das células tumorais de mama cultivadas durante 24 h em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino (C) ou na presença de albumina 2% (BSA) ou na presença de óleo de peixe-BSA complexados na proporção 1:5. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 experimentos em triplicata

\* $p < 0,001$  quando comparado a C e BSA.

## 6. DISCUSSÃO REFERENTE AOS PARÂMETROS *IN VITRO*

Os AGPI têm efeito significativo sobre crescimento e proliferação celular, onde os da família n-3, principalmente EPA e DHA, presentes no óleo de peixe (TABELA 7), têm demonstrado terem atividade antitumoral em tumores de cólon (LIPKIN *et al.*, 1999). TROMBETTA *et al.*, 2007 relataram que os AGPI tem ação citostática. Estudos do Laboratório de Metabolismo Celular, UFPR, demonstraram redução na proliferação do tumor de Walker 256, *in vivo* (TOGNI *et al.*, 2003; BONATTO *et al.*, 2004; PIZATO *et al.*, 2005, MUND *et al.*, 2007). A atividade antitumoral exercida pelo óleo de peixe pode ser resultado da inibição do crescimento celular, do aumento da apoptose das células tumorais ou de ambos (BERQUIN *et al.*, 2008). Para testar a primeira hipótese, realizamos culturas de células tumorais, o que segundo LEUHUBER *et al.*, 2006, são eficientes ferramentas de estudo porque permitem testar um grande número de tumores submetendo-os as mesmas condições. A maioria dos estudos utiliza ácidos graxos puros no meio de cultura, significando em alto custo financeiro. Porém, quando nos alimentamos, ingerimos alimentos que contêm gorduras, as quais são digeridas e posteriormente absorvidas. No plasma, os ácidos graxos são transportados ligados à albumina, a qual contém vários sítios de ligação para estes ácidos (HODSON *et al.*, 2008). Portanto, um experimento mais próximo do fisiológico seria aquele que mimetizaria esta situação através da complexação do óleo de peixe à albumina. Assim, ao adicionarmos óleo de peixe-BSA complexado (TABELA 8) ao meio de cultura, estaríamos efetuando o mesmo mecanismo de transporte e entrega de lipídios às células.

A adição do complexado óleo de peixe-BSA a cultura de células tumorais humanas colorretais (FIGURA 30) e de mama (FIGURA 31) levou a redução da proliferação em aproximadamente duas vezes em relação aos respectivos grupos controle, na concentração de 1:5 (20 mM). Dados semelhantes foram encontrados por OLIVEIRA, 2006, em culturas de tumor de Walker 256, usando o mesmo complexado óleo de peixe-BSA na diluição 1:8. Uma possível explicação para este achado é que os AGPI do tipo EPA tem a capacidade de alterar as concentrações de cálcio intracelulares, liberando  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e inibindo seu influxo por

canais da membrana celular, resultando em depleção dos estoques intracelulares, causando inibição de oncogenes e ciclinas G1 (AKTAS & HALPERIN, 2004). Porém, essa hipótese não foi testada.

Um dos objetivos das pesquisas sobre câncer é tentar fazer as células malignas morrerem seletivamente. Muitos tipos de morte celular foram identificados como: apoptose (intrínseca e extrínseca) necrose, catástrofes mitóticas e autofagia. Apoptose é caracterizada por certas mudanças morfológicas, tais como formação de enrugamentos da membrana, condensação da cromatina nuclear, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos (LETAI, 2008). Estes processos são controlados por vias de sinalizações que podem ser induzidas por estímulos internos ou externos (LI *et al.*, 2008). O processo de apoptose intrínseco é desencadeado por vários mecanismos de estresse e injúria celular, como hipóxia, danos ao DNA e indução de oncogenes. A via de sinalização celular converge para a mitocôndria e culmina na permeabilidade mitocondrial com a liberação de citocromo c. Uma das etapas desta via é o balanço entre as proteínas pró-apoptóticas BAX/BAK e anti-apoptóticas Bcl2 (HOUSTON & O'CONNEL, 2004). A via apoptótica extrínseca é ativada por receptores da morte (FASL e TNFR) na superfície celular (OKADA & MAK, 2004). Em indivíduos que fazem quimioterapia anticâncer os tipos de morte celulares mais comuns são a necrose e as catástrofes mitóticas, que poderão acabar em apoptoses (LOWE *et al.*, 2004).

A taxa de apoptoses nas células tumorais de melanoma, colorretais e de mama estava aumentada em aproximadamente, duas vezes na diluição 1:5 em relação aos demais grupos (FIGURAS 32, 32 e 34), respectivamente. Nossos dados corroboram os de TANAKA *et al.*, 2008, que observaram maior número de apoptoses em cultura de células tumorais humanas, das linhagens de carcinoma pulmonar RERF-LC-OK, células A459, tumor de cólon WiDr tumor de estômago MKN45, tratadas com lipossomos híbridos contendo AGPI. HONG, *et al.*, 2005 afirmam que o óleo de peixe reduz os danos ao DNA, diminui a proliferação celular e aumenta apoptose em ratos portadores de tumor de cólon. Outro possível mecanismo é que os AGPI n-3 podem se ligar diretamente a receptores nucleares, incluindo receptor ativador para proliferação de peroxissomos (PPAR). Esta ligação pode modular a homeostase celular podendo levar

a apoptose ou diferenciação celular (SCHROEDER *et al.*, 2008). Apoptose parece estar ligada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição das enzimas antioxidantes. A lipoperoxidação da membrana gera um radical livre que desencadeia a apoptose, pois permite a abertura de poros na membrana mitocondrial liberando citocromo c no citosol, levando a célula ao processo apoptótico (NAIR *et al.*, 2007). A produção de hidroperóxidos nas culturas de células tumorais aumentou em três vezes quando foi adicionado o complexado óleo de peixe-BSA, nas culturas de tumores de estômago (FIGURA 38). Nos tumores colorretais houve aumento de aproximadamente sete vezes (FIGURA 39) e nas células de tumores de mama ocorreu aumento de 8,5 vezes (FIGURA 40). Estes resultados corroboram os de UDIOLOVA *et al.*, 2003, em cultura de células IEC 18, SW480 e HT29/H11 e também de PASKIN & CARTER, 2008.

A morte celular ocasionada por necrose ocorre geralmente em resposta a injúria severa, levando ao inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular, desencadeando intenso processo inflamatório que pode levar a injúria e assim afetar e lesar células vizinhas (RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007). A taxa de necrose foi reduzida em duas vezes nas culturas de melanoma que receberam óleo de peixe-BSA complexado (FIGURA 34), seis vezes nas culturas de células tumorais colorretais (FIGURA 35) e cinco vezes nas células de tumores de mama (FIGURA 37). Este achado talvez possa ser explicado pelo fato dos AGPI n-3 possuírem menor habilidade inflamatória. Isto ocorre porque eles competem com o ácido araquidônico para a síntese eicosanóides, e assim levam ao aumento da síntese de prostaglandinas da série 3 e de leucotrienos da série 5, ambos menos potentes que os análogos produzidos pelo ácido araquidônico, da série 2 e 4, respectivamente (ANDRADE, *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos e experimentais indicam que mudanças no tipo de lipídio consumido podem modificar a composição de muitos tipos celulares, incluindo aquelas que estão envolvidas no desenvolvimento de muitas doenças imunológicas e inflamatórias e diminuir a proliferação celular (VÁSQUEZ, *et al.*, 2004). Essa substituição de ácidos graxos foi encontrada nas culturas de células tumorais em que foi adicionado óleo de peixe-BSA complexado (TABELAS 9 e 10), onde a incorporação de EPA e DHA levou a redução

do AA nas culturas de células tumorais. A incorporação destes ácidos graxos pode ser um co-adjuvante nas terapias anticâncer, pois segundo TROMBETTA *et al.*, 2007 as células tumorais são caracterizadas por possuírem pequenas concentrações de AGPI e, isto contribui para a resistência a quimioterápicos e a peroxidação lipídica.

Ácido araquidônico é um ativador do PPAR e isso geralmente aumenta a expressão da COX-2 (ZAO, *et al.*, 2006). Estudos que visam diminuir a expressão da COX-2 são importantes, porque há evidências mostrando que os usos de drogas antiinflamatórias, não esteroidais, reduzem o risco de desenvolver câncer colorretal em 40 a 50% (WANG & DUBOIS, 2008). A expressão exacerbada da COX-2 tem sido mostrada em diversos tipos tumorais. Uma das possíveis explicações para este fato é o aumento da expressão de bcl-2 e a baixa expressão do receptor para TGF- $\beta$ , porque isso leva a redução dos processos de apoptose e como resultado final aumento da proliferação celular (CORCORAN, *et al.*, 2005; ENDERS, 2007).

A prevenção é a mais promissora opção para controlar o câncer. Essa prevenção pode ser feita de três maneiras: primeiramente pela eliminação de fatores que causam o câncer, como por exemplo o cigarro. Em segundo, remoção de lesões pré-cancerosas, por exemplo, ressecção de adenomas de cólon; e finalmente contra atacar vias patogênicas de sinalização como, por exemplo, usando antiinflamatórios não esteroidais e/ou nutrientes que reduzam respostas inflamatórias (RIGAS & SUN, 2008). Assim o consumo de AGPI n-3 pode oferecer um caminho não tóxico para melhorar o tratamento do câncer, ajudar a quimioterapia e aumentar significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

## 7. CONCLUSÕES

A suplementação com óleo de peixe, 2 g/dia durante oito semanas em pacientes pós-remoção dos tumores, submetidos à quimioterapia anticâncer provocou:

- Aumento da massa corpórea em 63%;
- Aumentou a atividade fagocitária e produção de ânion superóxido nos neutrófilos, mas não alterou a captação de vermelho neutro ou produção de peróxido de hidrogênio.
- Aumentou a incorporação de EPA e DHA e redução de AA nos neutrófilos e no plasma;
- Não alteração do colesterol total, LDL, VLDL e triacilgliceróis, porém estes valores foram mais elevados nos indivíduos sem suplementação;
- Aumentou o colesterol HDL;
- Reduziu a lactatemia;
- Não induziu neutropenia nem linfopenia;

Os dados *in vitro* com complexado de óleo de peixe-BSA adicionado nas culturas celulares de tumores humanos promoveu:

- Incorporação de EPA e DHA e redução do AA nas células tumorais de cólon e mama;
- Redução da proliferação nas diluições de 1:5 e 1:10 nas culturas de células tumorais de mama e cólon;
- Aumento da taxa de apoptose e redução da necrose nas culturas de células tumorais de cólon, mama e melanoma;
- Aumento da produção de hidroperóxidos nas culturas de células tumorais de cólon, mama e estômago;



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R.J. Longchain n –3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovascular Research**, **52**:361-371, 2001.
- ABUSHUFA, R., REED, P., WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, **40**:1707-1712, 1994.
- ADEREN, A.; UNDERHILL. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Reviews Immunology**, **17**:593-623, 1999.
- AKTAS, H.; HALPERIN, J.A. Translational regulation of gene expression by omega-3 fatty acids. **Journal of Nutrition**, **134**:2487–2491, 2004.
- ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J.D. **Biologia molecular e celular**, 3 ed., Artmed, Porto Alegre, 1997.
- ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: The role of  $\omega$  - 3 fatty acids. **Nutrition**. **14**:627-633, 1998.
- ANDRADE, P.M.M.; RIBEIRO, B.G.; BOZZA, M.T.; ROSA, L.F.B.C.; CARMO, M.G.T. Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **77**:139–145, 2007.
- ARAB, L. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status. **Journal of Nutritional**, **133**:925-932, 2003.
- ARGILÉS, J.M. Cancer-associated malnutrition. **European Journal of Oncology Nursing**, **9**:39-50, 2005.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L.M. Cancer an inflammatory link. **Nature**, **431**:405-406, 2004.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** **357**:539–545, 2001.
- BARBER, M. D. Cancer cachexia treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, **17**:751-755, 2001.
- BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C.H. Cancer cachexia. **Surgical Oncology**, **8**:133-141, 1999.

BAUER, J.D.; CAPRA, S. Nutrition intervention improves outcomes in patients with cancer cachexia receiving chemotherapy — a pilot study. **Support Care Cancer** **13**:270–274, 2005.

BENETOU, V.; TRICHOPOULOU, A.; ORFANOS, P.; NASKA, A.; LAGIOU, P.; BOFFETTA, P.; TRICHOPOULOS, D. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. **British Journal of Cancer**, **99**:191 – 195, 2008.

BERQUIN, I.M.; EDWARDS, I.J.; CHEN, Y.Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Letters**, 2008 (no prelo).

BHARDWAJ, N. Harnessing the immune system to treat cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, **117**:1130-1136, 2007.

BIONDO, P.D.; BRINDLEY, D.N.; SAWYER, M.B.; FIELD, C.J. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2008 (no prelo).

BONATTO, S.J.R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H.H.P.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, **231**:56–62, 2004.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, **5**:9-15, 1976.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annal Biochemistry**, **72**: 248-254, 1976.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION (BNF). N-3 Fatty acids and health. **Briefing paper**. London, 1999.

BRUERA, E.; STRASSER, F.; PALMER, J.L. Effect of fish oil on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and anorexia/cachexia: A double-blind, placebo-controlled study. **Journal Clinical Oncology**, **21**:129-134, 2003.

BRUNO, O.; BRULLO, C.; ARDUINO, N.; SCHENONE, S.; RANISE, A.; BONDAVALLI, F.; OTTONELLO, L.; DAPINO, P.; DALLEGRI, F. Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. **IL Farmaco**, **59**:223-235, 2004.

CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, **21**:309-341, 2001.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, **87**:31-48, 2002.

CHE, Z.M.; JUNG, T.H.; CHOI, J.H.; YOON, D.J.; JEONG, H.J.; LEE, E.J.; KIM, J. Collagen-based co-culture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **346**:268–275, 2006.

CHEN, L.Y.; LAWSON, J.L.; MEHTA, J.L. Reduction in human neutrophil superoxide anion generation by n-3 polyunsaturated fatty acids: role of cyclooxygenase products and endothelium-derived relaxing factor. **Thrombosis Research**, **76**:317-322, 1994.

CHIN, L; GRAY, J.W. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. **Nature**, **452**:553-563, 2008.

CLELAND, L.G.; JAMES, M.J.; NEUMANN, M.A.; D'ANGELO, M.; GIBSON, R.A. Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects. **American Journal Clinical Nutrition**, **55**:395–399, 1992.

CORCORAN, C.A.; HE, Q.; HUANG, Y.; SHEIKH, M. S. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. **Oncogene**, **24**: 1634–1640, 2005.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, **420**:860-867, 2002.

CRIGHTON, M.H.; PUPPIONE, A. A. Geriatric neutrophils: implication for older adults. **Seminars in Oncology Nursing**, **22**: 3–9, 2006.

CURI, R; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, 2002.

DERECKA, K.; SHELDRIK, E.L.; WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; FLINT, A.P.F. A PPAR-independent pathway to PUFA-induced COX-2 expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **287**:65–71, 2008.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. **Molecular Endocrinology**, **18**:1321–1332, 2004.

DORSAM, R.T.; GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nature Reviews Cancer**, **7**:79-94, 2007.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Citokines and advanced cancer. **Journal Pain and Symptom Management** **20**: 214-232, 2000.

DYERBERG, J.; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acids composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **American Journal Clinical Nutrition**, **28**:958-966, 1975.

EBERHART, C.E.; COFFEY, R.J.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F.M.; FERRENBACH, S.; DUBOIS, R.N. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, **107**:1183–1188, 1994.

ENDERS, G.A. Cyclooxygenase-2 overexpression abrogates the antiproliferative effects of TGF- $\beta$ . **British Journal of Cancer**, **97**:1388–1392, 2007.

ENDRES, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E.; GEORGILIS, K.; LONNEMANN, G.; VAN DER MEER, J.W.M.; CANNON, J.G.; ROGERS, T.S.; KLEMPNER, M.S.; WEBER, P.C.; SCHAEFER, E.J.; WOLFF, S.M.; DINARELLO, C.A. The effect of dietary supplementation with *n*-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **New England Journal of Medicine**, **320**:265-271, 1989.

ENGEL, N.K.; WINTER, H.; RÜTTINGER, D.; SHAU, I.; SCHILLER, M.; MAYER, B.; MOUDGIL, T.; MEIMARAKIS, G.; STOLTE, M.; JAUCH, K.W.; FOX, B.A.; HATZ, R.A. Characterization of immune responses in gastric cancer patients: A possible impact of *H. pylori* to polarize a tumor-specific type 1 response? **Clinical Immunology**, **120**:285-296, 2006.

ENGLE, JONES, J.B. Causes and elimination of essential blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers, improved conditions of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, **88**:475-484, 1978.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.; MURPHY, R.C.; RAETZ C.R.H.; RUSSELL, D.W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M.S.; WHITE, S.H.; WITZTUM, J.L.; DENNIS, E.A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, **46**:839-861, 2005.

FEARON, K.C.H.; BARBER, M.D.; MOSES, A.G.; AHMEDZAI, S.H.; TAYLOR, G.S.; TISDALE, M. J.; MURRAY, G.D. Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. **Journal of Clinical Oncology**, **21**:3401-3407, 2006.

FEARON, K.C.H.; VON MEYENFELDT, M.F.; MOSES, A.G.W.; VAN GEENEN, R.; ROY, A.; GOUMA, D. J.; GIACOSA, A.; VAN GOSSUM, A.; BAUER, J.; BARBER, M.D.; AARONSON, N.K.; VOSS, A.C.; TISDALE, M. J. Effect of a protein and energy dense *n*-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. **Gut**, **52**:1479–1486, 2003.

FELLER, S.E.; GAWRISCH, K.; MACKERELL, A.D. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. **Journal American Chemistry Society**, **124**:318–326, 2002.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. Atheneu, São Paulo, 2004.

FISHER, M.; LEVINE, P.H.; WEINER, B.H.; JOHNSON, M.H.; DOYLE, E.M.; ELLIS, P.A.; HOOGASIAN, J.J. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. **American Journal Clinical Nutrition**, **51**:804–808, 1990.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. Simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, 497–509, 1953.

FREIN, D.; SCHILDKNECHT, S.; BACHSCHMID, M.; ULLRICH, V. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. **Biochemical Pharmacology** **70**:811–823, 2005.

FRITSCH, K.; IRONS, R.; POMPOS, L.; JANES, J.; ZHENG, Z.; BROWN, C. Omega-3 polyunsaturated fatty acid impairment of early host resistance against *Listeria monocytogenes* infection is independent of neutrophil infiltration and function. **Cellular Immunology**, **235**:65–71, 2005.

GAGNON, E.; DUCLOS, S.; RONDEAU, C.; CHEVET, E.; CAMERON, P.H.; STEELE-MORTIMER, O.; PAIEMENT, J.; BERGERON, J.J.M.; DESJARDINS, M. Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. **Cell**, **110**:119–131, 2002.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammation diseases. **Biomedicine Pharmacotherapy**, **56**:388–396, 2002.

GONZALEZ, C.; AGAPITO, M. T.; ROCHER, A.; GONZALEZ-MARTIN, M. C.; VEGA-AGAPITO, V.; GOMEZ-NIÑO, A.; RIGUAL, R.; CASTAÑEDA, J.; OBESO, A. Chemoreception in the context of the general biology of ROS. **Respiratory Physiology Neurobiology**, **157**:30–44, 2007.

GORJÃO, R.; VERLENGIAB, R.; LIMA, T.M.; SORIANOC, F.G.; BOAVENTURA, M.F.C.; KANUNFRED, C.C.; PERES, C.M.; SAMPAIO, S.C.; OTTON, R.; FOLADOR, A.; MARTINS, E.F.; CURI T.C.P.; PORTIOLLI, E.P.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clinical Nutrition**, **25**:923–938, 2006.

GRIMBLE, R.F. Nutritional modulation of cytokines biology. **Nutrition**, **14**:634–640, 1998.

GRINER, E.M.; KAZANIETZ, M.G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature Reviews Cancer**, **7**:281–294, 2007.

GUIMARÃES, G.C.; OLIVEIRA, T.; AIBARA, E.H.; LOPES, A.; MONTAGNINI, A.L. Nutrição e câncer. **Acta Oncologica Brasileira**, **22**:227–232, 2002.

GUPTA, R.A.; DUBOIS, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nature Reviews Cancer**, **1**:11–21, 2001.

HAMILTON, S., HAMILTON, R. J., SEWELL, P. A. Extration of lipids derivate formation in: HAMILTON, R. J. & HAMILTON, S. **Lipid analysis – a practical approach**. Chapter 2. IRL Press at Oxford University Press, p.54, 1992.

HAMMARSTRON, S. Leukotrienes. **Annual Reviews Biochemistry**, **52**:355-377, 1983.

HAN, J.; ULEVITCH, R. The intricate interface between immune system and metabolism. **Nature Immunology**, **12**:1198-1205, 2005.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, **100**:57-70, 2000.

HANNUN, Y.A.; OBEID, L. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Molecular Cell Biology**, **9**:139-150, 2008.

HARDMAN, W.E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. International Research Conference on Food Nutrition, and Cancer. **American Society for Nutritional Sciences**, **22**:3427-3430, 2004.

HARRIS, W.S. N-3 Fatty acids and human lipoprotein metabolism: an update. **Lipids**, **34**:257–8, 1999.

HAYHURST, G.P.; LEE, Y.H.; LAMBERT, G.; WARD, J.M.; GONZALEZ, F.J. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. **Molecular Cell Biology**, **21**:1393–1403, 2001.

HE, K.; RIMM, E.B.; MERCHANT, A.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Fish consumption and risk of stroke in men. **JAMA**, **288**:3130-3136, 2002.

HODSON, L.; SKEAFF, C.M.; FIELDING, B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. **Progress in Lipids Research**, 2008 (no prelo).

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The intricate interface between immune system and metabolism. **Nature immunology**, **10**:971-974, 2004.

HOFMANOVA, J.; VACULOVA, A; KOZUBIK, A. Polyunsaturated fatty acids sensitize human colon Adenocarcinoma HT-29 cells to death receptor-mediated apoptosis. **Cancer Letters**, **218**:33-41, 2005.

HONG, M.Y.; BANCROFT, L.K.; TURNER, N.D.; DAVIDSON, L.A.; MURPHY, M.E.; CARROLL, R.J.; CHAPKIN, R.S.; LUPTON, J.R. Fish oil decreases oxidative DNA damage by enhancing apoptosis in rat colon. **Nutrition Cancer** **52**:166–175, 2005.

HOUSTON, A. O'CONNELL, J. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, **4**:1-6, 2004.

HUNTER, K.W. Host genetics and tumour metastasis. **British Journal of Cancer**, **90**:752-755, 2004.

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **9**:125-138, 2008.

IVANOVA, P.T.; MILNE, S.B.; BYRNE, M.O.; XIANG, Y.; BROWN, H.A. Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry. **Methods in Enzymology**, **432**:21-54, 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JIANG, W.G.; BRYCE, R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology/hematology**, **27**:179-209, 1998.

JUMP, D.B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, **277**:8755-8758, 2002.

KARIN, M.; GRETEN, F. NF-KB: Linking Inflammation and Immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, **5**:749-759, 2005.

KAUR, I.; SIMONS, E.R.; CASTRO, V.A.; OTT, C.M.; PIERSON, D.L. Changes in neutrophil functions in astronauts. **Brain, Behavior, and Immunity**, **18**:443-450, 2004.

KAWAGISHI, C.; KUROSAKA, K.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Cytokine production by macrophages in association with phagocytosis of etoposide-treated P388 cells in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1541**:221-230, 2001.

KELLY, P. The cancer critical care paradox. **Current Anaesthesia & Critical Care**, **19**:96-104, 2008.

KIM, J.S.; KWON, H.Y.; CHOI, W.H.; JEON, C.Y.; KIM, J.I; KIM, J.; LEE, J.Y.; KIM, Y.S.; PARK, J.B. Phagocytosis of serum and IgG-opsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1. **Experimental and Molecular Medicine**, **35**:211-221, 2003.

KITANO, H. Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, **4**:227-235, 2004.

KOCH, T.; HELLER, A.R. Benefits of  $\omega$ -3 fatty acids in parenteral nutrition. **Clinical Nutrition Supplements**, **1**:17-24, 2005.

LANDS, B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. **Progress in Lipids Research**, 2008 (no prelo).

LAPILLONNE, A.; CLARKE, S.; HEIRD, W. Plausible mechanisms for effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on growth. **Journal of Pediatricians**, **143**:9-16, 2003.

LE GUEVEL, R.; PAKDEL, F. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. **Human Reproduction** **16**:1030–1036, 2001.

LEAVER, H.A; CRAIG, S.R. ; YAP, P.L.; WILLIAMS, J.R.; WALKER, W.S. Arachidonic Acid Activation of Monocyte and Neutrophil Reactive Oxygen in Lung Cancer Patients Undergoing Pulmonary Resection. **The International Association of Biological Standardization**, **24**:319-324, 1996.

LEHNINGER, A. NELSON, D. L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. Sarvier, São Paulo, 2000.

LEMMON, M.A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. **Molecular Cell Biology**, **9**:99-111, 2008.

LETAI, A.G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, **8**:121-132, 2008.

LEUHUBER, K.; KLEPAL, W.; HAUSOTT, B.; MARIAN, B. Apoptosis in a tissue-like culture model of human colorectal adenoma cells. **Tissue and cell**, **38**:203-208, 2006.

LEVY, B.D.; CLISH, C.B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C.N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature Immunology**, **2**: 612–619, 2001.

LI, Q.X.; YU, D.H.; LIU, G.; KE, N.; MCKELVY, J.; WONG-STAAAL, F. Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. **Cell Death and Differentiation**, **15**:1197–1210, 2008.

LI, Y.; FERRANTE, A.; POULOS, A.; HARVEY, D.P. Neutrophil oxygen radical generation: Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. **Journal Clinical Investigation**, **97**:1605-1609, 1996.

LIANG, B.; WANG, S.; YE, Y.J.; YANG, X.D.; WANG, Y.L.; QU, J.; XIE, Q.W.; YIN, M.J. Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World Journal of Gastroenterology**, **15**:2434-2449, 2008.

LIPKIN, M.; REDDY, B.; NEWMARK, H.; LAMPRECHT, S.A. Dietary factors in human colorectal cancer. **Annual Reviews Nutrition**, **19**:545-586, 1999.



LLOYD, D.A.J. \*, PAYNTON, S. E.; BASSETT, P.; MATEOS, A.R.; LOVEGROVE, J.A.; GABE S.M.; GRIFFIN, B.A. Assessment of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid status and clinical outcome in adults receiving home parenteral nutrition. **Clinical Nutrition**, 2008 (no prelo).

LÖF, M.; SANDIN, S.; LAGIOU, P.; HILAKIVI-CLARKE, L.; TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.O.; WEIDERPASS, E. Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. **British Journal of Cancer**, **97**:1570–1576, 2007.

LOWE, S.W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, **42**:307-315, 2004.

LU, G.; WINDSOR, L.S.; HARRIS, W.S. Omega-3 fatty acids alter lipoprotein subfraction distributions and the *in vitro* conversion of very low density lipoproteins to low density lipoproteins. **Journal Nutrition Biochemistry**, **10**:151-158, 1999.

LUOSTARINEN, R; SIEGBAHN, A. SALDEEN, T. Effect of dietary fish oil supplemented with different doses of vitamin E on neutrophil chemotaxis in healthy volunteers. **Nutrition Research**, **12**:1419 –1430, 1992.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKILL, F. Cancer related inflammation. **Nature**, **454**:436-444, 2008.

MATARESE, G.; La CAVA, A. The intricate interface between immune system and metabolism. **TRENDS in Immunology**, **25**:193-200, 2004.

MAYER, K.; FEGBEUTEL, C.; HATTAR, K.; SIBELIUS, U.; KRÄMER, H.J.; HEUER, K.U.; TEMMESFELD-WOLLBRÜCK, B.; GOKORSCH, S.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W. Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. **Intensive Care Medicine**, **29**:1472-1481, 2003.

MCENTEE, M. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomedical Pharmacotherapy**, **56**: 380-387, 2002.

MCMAHON, B.; GODSON, C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. **American Journal of Physiology**, **286**:189-201, 2004.

MEER, G. Caveolin, Cholesterol, and Lipid Droplets? **The Journal of Cell Biology**, **152**:29-34, 2001.

MEER, G.; VOELKER, D.R.; FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Molecular Cell Biology**, **9**:112-124, 2008.

MENENDEZ, J.A; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nature Reviews Cancer**, **7**:763-777, 2007.

MIYSAKA, C. K.; MANZINI, J. LAJOLO, F. M.; CURI, R. Implicações clínicas e nutricionais dos ácidos grãos poliinsaturados  $\omega$  - 3 dos óleos de peixe. SP. **Laes & Haes**, **98**:68-75, 1996.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W.; SPECTS, A. A. **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**. 5ª ed. Artes Médicas. São Paulo, 1994.

MOORE, C.S.; BRYANT,S.P.; MISHRA, G.D.; KREBS, J.D.; BROWNING, L.M.; MILLER, G.J.; JEBB, S.A. Oily fish reduces plasma triacylglycerols: a primary prevention study in overweight men and women. **Nutrition**, **22**:1012–1024, 2006.

MORAES, T.J.; DOWNEY, G.P. Neutrophil cell signaling in infection: role of phosphatidylinositide 3-kinase. **Microbes and Infection**, **5**:1293–1298, 2003.

MORENO, E. Is cell competition relevant to cancer? **Nature Reviews Cancer**, **8**:141-147, 2008.

MORISCO, F.; VITAGLIONE, P.; AMORUSO, D.; RUSSO, B.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N. Foods and Liver Health. **Molecular Aspects of Medicine**, **29**:144-150, 2008.

MUND, R.C.; PIZATO, N.; BONATTO, S.J.R.; NUNES, E.A.; VICENZI, T.; TANHOFFER, R.; OLIVEIRA, H.H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **76**: 113–120, 2007.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipids Research**, **47**:127-146, 2008.

NAIR, U.; BARSTCH, H.; NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans **Free Radical Biology & Medicine**, **43**:1109–1120, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Diet and Health: Implications for reducing chronic disease risk**. Washington, DC.: National Academy Press, 1989.

NETTLETON, J.A. **Omega-3 fatty acids and health**. Chapman & Hall. New York, 1995.

NIEDERGANG, F; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis:many roads lead to the phagosome. **Current Opinion in Cell Biology**, **16**:422–428, 2004.

NISHIYAMA-NARUKE, *et al.* HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at low temperature analyses of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, **31**:2565-2576, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SAMARDI, J.; WOLFF, S.P. Measuremet of plasma hydroperoxide concentrations by ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, **220**: 403-409, 1994.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, **4**:592-603, 2004.

OLIVEIRA, H.H.P. **Cultivo de células ascítica do tumor de Walker 256 na presença de óleo de peixe-BSA complexado: Efeitos sobre proliferação e morte celular e seus mecanismos de ação.** 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular com ênfase em Fisiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PABLO, M. A.; PUUERTOLLANO, M. A.; CIENFUEGOS, G. A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **29**: 323-328, 2000.

PANCHAUD, A.; SAUTY, A.; KERNEN, Y.; DECOSTERD, L.A.; BUCLIN, T.; BOULAT, O.; HUG, C.; PILET, M.; ROULET, M. Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: A randomized, crossover placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, **25**: 418–427, 2006.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R.H.; BRANDT, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, **8**:329-340, 2008.

PESKIN, B.S.; CARTER, M.J. Chronic cellular hypoxia as the prime cause of cancer: What is the de-oxygenating role of adulterated and improper ratios of polyunsaturated fatty acids when incorporated into cell membranes? **Medical Hypotheses**, **70**:298–304, 2008.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal Immunologic Methods**, **46**: 211-226, 1981.

PIKE, L.J. Lipids rafts: bringing order to chaos. **Journal of Lipid Research**, **44**:655-667, 2003.

PINTO JR, J.A.; FOLADOR, A. BONATTO, S.J.R., AIKAWA, J. YAMAZAKI, R.K., PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.H.P.; NALIWAICO, K.; FERRAZ, A.C.; NISHIYAMA, A. FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **15**:358–365, 2004.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Technology Fish Immunology**, **4**:93-100, 1995.

PIZATO, N.; BONATTO, S.J.R.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; PICONCELLI, M.; NALIWAICO, K.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 Tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, **53**:194-201, 2005.

RAPP, K.; SCHROEDER, J.; KLENK, J.; STOEHR, S.; ULMER, H.; CONCIN, H.; DIEM, G.; OBERAIGNER, W.; WEILAND, S.K. Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145 000 adults in Austria. **British Journal of Cancer**, **93**:1062-1067, 2005.

RAVICHANDRAN, K.S.; LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature Reviews Immunology**, **7**:965-974, 2007.

READ, J.A.; BEALE, P.J.; VOLKER, D.H.; SMITH, N.; CHILDS, A.; CLARKE, S.J. Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. **Support Care Cancer**, **15**:301–307, 2007.

RHEE, Y.; PAIK, M.J.; KIM, K.R.; KO, Y.G.; KANG, E. S.; CHA, B.S.; LEE, H.C.; LIM, S.K. Plasma free fatty acid level patterns according to cardiovascular risk status in postmenopausal women. **Clinica Chimica Acta**, **392**:11–16, 2008.

RIGAS, B.; SUN, Y. Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. **British Journal of Cancer**, **98**:1157–1160, 2008.

RITTIG, M.G.; WILSKE, B.; KRAUSE, A. Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? **Microbes and Infection**, **1**:727–735, 1999.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, **23**:139-151, 2004.

SACKS, F.M.; CAMPOS, H. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: time to widen our view of the mechanisms. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, **91**:398–400, 2006.

SALA-VILA, A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. **Clinical and Experimental Allergy**, **38**:1432-1450, 2008.

SANE, S.; BABA, M.; KUSANO, C.; SHIRAO, K.; KAMADA, T.; AIKOU, T. Fat emulsion administration in the early postoperative period in patients undergoing esophagectomy for carcinoma depresses arachidonic acid metabolism in neutrophils. **Nutrition**, **15**: 341-346, 1999.

SANSONETTI, P.J. War and peace at mucosal surfaces. **Nature Reviews Immunology**, **4**:953-963, 2004.

SAUER, L.A.; BLASK, D.E.; DAUCHY, R.T. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **18**:637–649, 2007.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D.E. Mechanism for the antitumor and anticachectic of n-3 fatty acids. **Cancer Research**, **60**:5289-5295, 2000.

SCHIANO, V.; LAURENZANO, E.; BREVETTI, G.; DE MAIO, J.I.; LANERO, S.; SCOPACASA, F.; CHIARIELLO, M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid in peripheral arterial disease: Effect on lipid pattern, disease severity, inflammation profile, and endothelial function. **Clinical Nutrition**, **27**:241-247, 2008.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, **45**:231-241, 2008.

SCHROEDER, F.; PETRESCU, A.D.; HUANG, H.; ATSHAVES, B.P.; MCINTOSH, A.L.; MARTIN, G.G.; HOSTETLER, H.A.; VESPA, A.; LANDROCK, D.; LANDROCK, K.K.; PAYNE, H.R.; KIER, A.B. Role of Fatty Acid Binding Proteins and Long Chain Fatty Acids in Modulating Nuclear Receptors and Gene Transcription. **Lipids** **43**:1–17, 2008.

SERHAN, N.C.; CHIANG, N.; Van DYKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, **8**:349-361, 2008.

SHAIKH, S.R.; EDIDIN, M. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection. **Chemistry and Physics of Lipids**, **153**:24–33, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **60**:502–507, 2006.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **56**:365-379, 2002.

SPRECHER, D.L.; MASSIEN, C.; PEARCE, G. Triglyceride: high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biological**, **27**:359–365, 2007.

STARK, K.D. The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues. **Lipids**, **43**:45–53, 2008.

STEHR, S.N.; HELLER, A.R. Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery. **Clinica Chimica Acta**, **373**:1-8, 2006.

STILLWELL, W.; WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, **126**:1–27, 2003.

STUART, L.M.; EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nature reviews Immunology**, **8**:131-141, 2008.

SURETTE, M.E.; EDENS, M.; CHILTON, F.H.; TRAMPOSCH, K.M. Dietary Echium Oil Increases Plasma and Neutrophil Long-Chain (n-3) Fatty Acids and Lowers Serum Triacylglycerols in Hypertriglyceridemic Humans. **Journal of Nutrition**, **22**:1406-1411, 2004.

SWITZER, K.C.; MCMURRAY, D.N.; CHAPKIN, R.S. Effects of dietary n–3 polyunsaturated fatty acids on T-cell membrane composition and function. **Lipids** **39**: 1163–1170, 2004.

SZWEDA, P.A.; FRIGUET, B.; SZWEDA, L.I. Serial Review: Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology & Medicine**, **33**:29–36, 2002.

TANAKA, Y.; GOTO, K.; MATSUMOTO, Y; UEOKA, R. Remarkably high inhibitory effects of docosahexaenoic acid incorporated into hybrid liposomes on the growth of tumor cells along with apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, **359**:264-271, 2008.

TAPIERO, H.; NGUYEN, B; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **56**:215-222, 2002.

TAYAL, V.; KALRA, B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. **European Journal of Pharmacology**, **579**:1-12, 2008.

TEITELBAUM, J.E.; WALKE, W.A. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **12**:21–32, 2001.

THOMPSON, P.J.; MISSO, N.L.A.; PASSARELLI, M.; PHILLIPS, M.J. The effect of eicosapentaenoic acid consumption on human neutrophil chemiluminescence. **Lipids**, **26**:1223–1226, 1991.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, **17**:438-442, 2001.

TISDALE, M.J. Tumor-host interactions. **Journal Cell Biochemistry**, **93**:871-877, 2004.

TOGNI, V.; OTA, C.C.; FOLADOR, A.; JUNIOR, O.T.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A.; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P.C.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and cancer**, **46**:52-58, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer proteins from polyacrylamides gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of National Academy of Science of the USA**, **76**:4350-4354, 1979.

TROMBETTA, A.; MAGGIORA, M.; MARTINASSO, G.; COTOGNI, P.; CANUTO, R.A.; MUZIO, G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. **Chemico-Biological Interactions**, **165**:239–250, 2007.

UDILOVA, N.; JUREK, D.; MARIAN, B.; GILLE, L. SCHULTE-HERMANN, R.; NOHL, H. Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. **Food and Chemical Toxicology**, **41**:1481–1489, 2003.

VÁZQUEZ, R.P.; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, E.; PERONA, J.S.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. Effects of Different Dietary Oils on Inflammatory Mediator Generation and Fatty Acid Composition in Rat Neutrophils. **Metabolism**, **53**:59-65, 2004.

VERMEULEN, L.; SPRICK, M.R.; KEMPER, K.; STASSI, G.; MEDEMA, J.P. Cancer stem cells – old concepts, new insights. **Cell Death and Differentiation**, **15**:947–958, 2008.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. Brain tumour stem cell. **Nature Reviews Cancer**, **6**:425-436, 2008.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, **6**:24-37, 2006.

VOLEK, J.S.; FERNANDEZ, M.L.; FEINMAN, R.D.; PHINNEY, S.D. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. **Progress in Lipids Research**, **47**:307-318, 2008.

WALSH, S.R.; COOK, E.J.; GOULDER, F.; JUSTIN, T.A.; KEELING, N.J. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in Colorectal Cancer. **Journal of Surgical Oncology**, 2005.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. **Cancer Letters**, **267**:197-203, 2008.

WASSAL, S.R.; STILLWELL, W. Docosa-hexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. **Chemistry and Physics of Lipids**, **153**:57-63, 2008.

WEIDEMANN, A.; JOHNSON, R.S. Biology of HIF- $\alpha$ . **Cell Death and Differentiation**, **15**:621-627, 2008.

WELCH, H.; MAURAN, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Nonreceptor Protein-Tyrosine Kinases in Neutrophil Activation. **METHODS: A Companion to Methods in Enzymology** **9**:607-618, 1996.

WIGMORE, S.J.; ROSS, A.J.; FALCONER, J.S.; PLESTER, C.E.; TISDALE, M.J.; CARTER, D.C.; FEARON, K.C.H. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Nutrition**, **12**:27-30, 1996.

WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J. Rebuilding the food pyramid. **Scientific American**, **288**:52-59, 2003.

WONG, P.W.; ENRIQUEZ, A.; BARRERA, R. Nutritional support in critically ill patients with cancer. **Critical Care Clinical**, **17**:743-767, 2001.

WORKMAN, P.; BILLY, E. Putting the heat on cancer: Two studies highlight the role of the heat shock response in initiating and maintaining cancer. **Nature Medicine**, **13**:1415-17, 2007.

WYMAN, M.P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Molecular Cell Biology**, **9**:162-176, 2008.

YEUNG, T.; OZDAMAR, B.; PAROUTIS, P.; GRINSTEIN, S. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, **18**:429-437, 2006.

YOULE, R.J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews, Molecular Cell Biology**, **9**:47-59, 2008.

ZHAO, C.; CHEN, W.; YANG, L.; CHEN, L.; STIMPSON, S.A.; DIEHL, A.M. PPAR $\gamma$  agonists prevent TGF $\beta$ 1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. **Biochemistry Biophysics Research Communication** **350**: 385-391, 2006.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature Reviews Immunology**, **8**: 59-73, 2008.



ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, **6**: 715-727, 2006.

ZURZOLO, C.; MEER, G.; MAYOR, S. The order of rafts. **European Molecular Biology Organization**, **4**:1117-1122, 2003.

# ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL ANGELINA CARON



**HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON**  
Comitê de Ética em Pesquisa

**OF CEP HAC 004/04**  
**Campina Grande do Sul, 20 de janeiro de 2004**

**Referência**  
**Aprovação do estudo clínico:**

***“Óleo de peixe e sua utilização no tratamento de pacientes com câncer”***

Para

- Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
Orientador do Projeto.  
Universidade Federal do Paraná
- Doutorando Sandro José Ribeiro Bonatto  
Aluno do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – Área de concentração em Fisiologia (Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná).

Comunicamos a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste hospital, do estudo clínico acima, e solicitamos o envio de relatórios parciais trimestrais a partir de seu início, bem como, alertamos que prévia à divulgação dos resultados obtidos estes deverão ser submetidos à avaliação pelo CEP-HAC e pela diretoria clínica deste hospital.

**Atenciosamente**

  
**Dr. João Carlos Domingues Repka**  
**CEP-HAC**



| Membros do CEP:              |                         |                |                          |                         |                |
|------------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|-------------------------|----------------|
| Beatriz de Souza Baternoster | Assistente Social       | Graduação      | Ana Cristina Hansaul     | Farmacêutica Bioquímica | Mestrado       |
| Fernando Zenóbio de Carvalho | Economista              | Especialização | Sunilda W. C. Marmanillo | Psicóloga               | Graduação      |
| Antonio Celso Albuquerque    | Advogado                | Graduação      | Irinei Melek             | Médico Clínico Geral    | Especialista   |
| João Eduardo Nicoluzzi       | Médico Cirurgião        | Doutorado      | Pedro Ernesto Caron      | Médico Cirurgião Geral  | Mestrado       |
| Antonio Borges Neto          | Farmacêutico Bioquímico | Graduação      | Cristiane Lange Sabóia   | Médica Hematologista    | Especialização |
| José Messias Almeida Santos  | Padre Teologia          | Graduação      | João Carlos Repka        | Farmacêutico Bioquímico | Doutorado      |
| Meire Cristiane Cordeiro     | Nutricionista           | Graduação      |                          |                         |                |

## ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPR



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê Setorial de Ética em Pesquisa



**Projeto: “Óleo de peixe e sua utilização no tratamento de pacientes com câncer”**

**Pesquisador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes**

**Departamento: Departamento de Fisiologia**

**Data de entrada no CEP-Biológicas: projeto não registrado**

**Registro CEP-Biológicas: projeto não registrado**

Curitiba, 24 de maio de 2004

Prezado Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Em relação a projeto acima citado, venho por meio desta informá-lo de que não há necessidade deste projeto ser avaliado pelo CEP-Biológicas pois o mesmo já foi aprovado pelo CEP do Hospital e Maternidade Angelina Caron, local em que todos os procedimentos (entrevista e exame clínico, tratamento, coleta de sangue, etc.) serão executados. A única etapa que ocorrerá no Setor de Ciências Biológicas será a análise do sangue coletado dos pacientes. Portanto, não se caracteriza um estudo multicêntrico, em que os pacientes são atendidos nos centros colaboradores, situação que exige a aprovação do projeto em cada centro colaborador. Em processo anterior, com situação similar, o CONEP se manifestou por não haver necessidade de aprovação pelo CEP-Biológicas no caso do material ser apenas analisado no Setor de Ciências Biológicas.

Contando com sua compreensão e apoio, coloco-me à disposição para maiores esclarecimentos, atenciosamente

Roberto Andreatini  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Setor de Ciências Biológicas da UFPR